

Mallone Lopes da Silva

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM
MODELO ANIMAL DE NOCICEÇÃO E EDEMA
INDUZIDOS PELA APLICAÇÃO SUBCUTÂNEA DE
INTERFERON-BETA (IFN- β)**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira
Coorientadora: Dra. Raquel Tonello

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lopes da Silva, Mallone

Caracterização farmacológica de um modelo animal
de nocicepção e edema induzidos pela aplicação
subcutânea de interferon-beta (IFN- γ) / Mallone Lopes
da Silva ; orientador, Juliano Ferreira,
coorientadora, Raquel Tonello, 2017.
137 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Citocina. 3. Terapia
modificadora. 4. Efeitos adversos. 5. Canais TRP.
I. Ferreira, Juliano. II. Tonello, Raquel. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

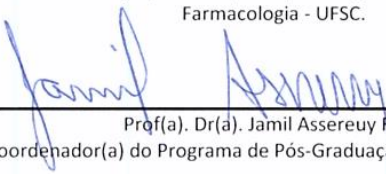
“Caracterização farmacológica de um modelo animal de nocicepção e edema induzidos pela aplicação subcutânea de interferon-beta (IFN- β)

”

Por

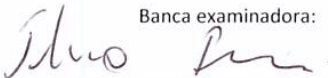
Mallone Lopes da Silva

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (10/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

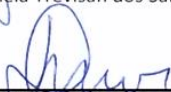
Banca examinadora:



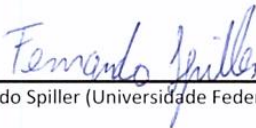
Dr(a) Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Gabriela Trevisan dos Santos (Universidade Federal de Santa Maria)



Dr(a) Daniel Mansur dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Fernando Spiller (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 16 de março de 2017.

Dedico este trabalho à minha mãe Sandra Maria Lopes da Silva, ao meu pai João Dias da Silva, à minha irmã Katty Mathoney Lopes da Silva, à minha tia Elzi Lopes Pereira, *in memoriam* ao meu avô Raimundo Nazareno Pereira, à minha avó Benedita Lopes Pereira, e ao meu tio Jomar Nascimento. Por último, mas não menos importante, dedico esta dissertação à minha amada Caitlin Meyers. Vocês são minha fonte diária de inspiração, amor, e carinho além de serem constantes exemplos de dedicação, determinação, perseverança e fé.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu amor incondicional, pela constante proteção e por me abençoar com as mais diversas oportunidades e experiências, por iluminar meus passos ao longo desta jornada, por enviar tantas pessoas maravilhosas ao meu encontro e por jamais me desamparar. Nada sou sem minha fé em Ti e tudo posso Contigo ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano Ferreira, agradeço imensamente por ter aceitado me orientar e assim ter me concedido a oportunidade ímpar de fazer parte da família Lab Ferreira. Obrigado por partilhar comigo um pouco de todo seu conhecimento ao longo destes dois anos, por aguçar minha curiosidade, e por me contagiar com sua vívida paixão pela ciência. Eu tenho uma grande admiração por quem o senhor é enquanto cientista e como pessoa, vou carregar para sempre todos seus ensinamentos. Obrigado pela amizade, pelos conselhos, pela confiança, pela paciência e por toda sua dedicação em me proporcionar uma boa formação enquanto aspirante a farmacologista e a cientista, foi realmente um privilégio aprender com o senhor. Enfim, obrigado por abrir não só as portas do seu laboratório, mas também da sua casa, e por me permitir fazer parte da sua vida.

À minha querida co-orientadora Dra. Raquel Tonello, mais conhecida como Chefa, por ter me abraçado assim que chegou em Floripa e por ter me transformado em seu pupilo. Obrigado por ter me auxiliado em todas as fases deste trabalho, mesmo à distância, pelo apoio incondicional e pelas palavras de incentivo que não me deixaram desistir quando eu achei que seria impossível terminar. Obrigado pela amizade, pelos maravilhosos momentos de descontração e pelas risadas que compartilhamos. Conviver e aprender com você foi um dos melhores presentes que ganhei durante o mestrado.

Ao meu amigo Dr. Francisney P. do Nascimento, o Ney, o Francisnelson, o Galo Véio Esporeador lá de Pato Branco, daí. Obrigado pela acolhida em Floripa, pela valorosa amizade, pelos conselhos bons e ruins, pelas churrascadas e happy hours durante seu pos-doc no Lab Ferreira. Pois afinal de contas, não te compremos pro refugio mô quiridu!

À minha amiga M.Sc. Suélen Detoni, por ter sido minha companheira incansável ao longo do Cursão e das demais disciplinas do mestrado que vencemos juntos. Obrigado pela amizade, pelos conselhos, pelas discussões científicas, pelo apoio e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis dessa jornada que fizemos juntos enquanto mestrando.

Admiro muito você e espero que possamos nos reunir novamente para matar as saudades e rir juntos lembrando as desventuras do mestrado.

Ao meu amigo e companheiro de Lab M.Sc. Sérgio José Macedo Junior, mais conhecido como Ginho, Guiguís, ou Galo Lageano. Meu querido, obrigado pela parceira na realização dos experimentos, por todas as randomizações, administrações e por ter guiado este “ceguinho” até o final. Obrigado também por todos os momentos de aprendizado e por ter dividido um pouco do seu conhecimento comigo, lhe admiro bastante por toda sua dedicação, inteligência e humildade, és uma fonte de inspiração para mim. Muito obrigado pela amizade, pelas discussões científicas, pelas caronas, pelos momentos de descontração com muitas “piadas boas”, pelas experiências compartilhadas em disciplinas, no GT3, na representação discente, enfim, obrigado por toda parceria durante esses dois anos fio.

À minha amiga e companheira Marcella Ferreira, a quem eu carinhosamente chamo de Mamá fêmea ou de Cellinha, obrigado por me aprovar no concorridíssimo processo seletivo que me garantiu uma vaga na sua vida como amigo. Realmente, não foi fácil de provar por A+B que tínhamos que ser amigos, mas consegui, te falei que eu era legal lol. Obrigado pelo último ano Cellinha, têm sido muito bom te perturbar a vida e te incomodar, sabes que esse é meu jeito meio (totalmente) torpe de demonstrar carinho e afeição. Obrigado pelas conversas, pelos momentos de desabafo, por me incentivar, por acreditar em mim, e pelas parcerias naqueles momentos em que relaxar era preciso. Enfim, obrigado por me conceder a oportunidade de fazer parte da sua vida e de ser seu amigo.

Aos queridos Pós-doutorandos do Lab Ferreira, Dra. Débora Lückemeyer e Dr. Arthur Prudente, ou melhor dizendo Debs e Bauru. Sou muito grato por todo ao auxílio durante o mestrado, principalmente nessa fase final. Debs, obrigado pelo providencial auxílio na realização dos experimentos de genotipagem. Obrigado também por cuidar da gente e não nos deixar passar fome no lab, sempre mantendo nossos armários cheios de mantimentos, e por sempre se colocar à disposição para emprestar seus conhecimentos e auxiliar no que for necessário. Bauru, obrigado por ensinar o protocolo para a realização dos experimentos com a RTX e pelo auxílio nos mesmos. Obrigado também pelo seu trabalho com os animais, que tornou possível a realização dos meus experimentos como um todo. E claro, obrigado por todo conhecimento científico e as mais aleatórias curiosidades que você compartilhou comigo, você é a nossa Enciclopédia Bauru. Agradeço a vocês pela amizade ao longo desses anos, e por terem “adotado” a mim e à Cellinha, como disse a Débs, especialmente por terem me

apresentado ao CrossFit, que têm sido fundamental para aliviar o estresse e ansiedade nessa fase terminal do mestrado. Muito obrigado mesmo!

À querida Dra. Murriel, por sempre me cumprimentar com um largo sorriso no rosto e com um gostoso abraço. Obrigado pelas constantes palavras de incentivo e pelas conversas, você não sabe o quanto esses simples gestos melhoravam os meus dias.

Aos professores Dr. Rui Prediger, Dr. Jamil Assereuy, Dra. Helena e Dr. Juliano Ferreira pela supervisão durante o estágio docência. Muito obrigado por terem me permitido vivenciar os desafios da sala de aula e por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências adquiridos ao longo de suas carreiras.

À Professora Dra. Gabriela Trevisan e aos Professores Dr. Daniel Mansur, Dr. Fernando Spiller e Dr. Rui Prediger por aceitarem o convite para compor a banca de avaliação desta dissertação, e pelas valorosas contribuições que certamente farão para o aprimoramento do trabalho.

Aos meus pais Sandra e João, não existem palavras que possam descrever o quão grato eu sou à Deus por ter vocês como pais. Obrigado pelo dom da vida, obrigado por todo amor, carinho e dedicação que vocês têm para comigo. Obrigado por acreditar nos meus sonhos e por sonhá-los junto comigo, e por sempre me apoiarem nas minhas decisões, mesmo quando elas resultam em eu ficar longe de vocês e longe de casa. A minha inspiração para continuar seguindo vêm de toda a dedicação e trabalho duro que sempre testemunhei na vida de vocês, vocês são o meu melhor exemplo, meus melhores professores, meus melhores amigos, e eu dedico cada vitória alcançada à Deus e a vocês. Amo muito vocês e estou morrendo de saudades, mal posso esperar para receber aquele abraço gostoso e apertado quando eu chegar em casa.

À minha irmã Katty Mathoney, por ser minha fonte de inspiração para os estudos desde que eu era criança, por me apoiar, por acreditar no meu potencial para trilhar essa jornada na vida acadêmica, por estar ao lado dos meus pais em todos esses anos nos quais eu não pude, por ser amiga, companheira e por sempre me receber em casa com um baita sorriso e abraços apertados. Te amo muito maninha!

To my girlfriend and soon to be wife Caitlin Meyers, for being my fortress in my moments of weakness, for being the light that casted away the shadows of my constant doubts, for being my friend, for being my partner, for being the past of me, for inspiring to be always be better, for your kindness, for your never-ending support, for always believing in me, sometimes even more than I did, for your unconditional love and for always

being there for me. I love you more than I could ever express with words and I can't wait to finally be reunited with you once again, and this time for good. Thank you for granting me the gift of loving you and for loving me back the way you do.

A todos os amigos e amigas, tanto os que eu trouxe comigo, quanto os que eu encontrei aqui em Floripa, obrigado por todo apoio e por acreditarem em mim. A jornada se tornou menos árdua com a presença de vocês ao meu lado.

Aos companheiros pós-graduandos, tanto do mestrado quanto do doutorado, que tive o prazer de conhecer, conviver, com quem aprendi e que compartilharam das aventuras dessa jornada comigo.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por contribuírem imensamente para minha formação acadêmica e profissional.

Aos funcionários que atuam no Departamento de Farmacologia, em especial à Scheila, à Dona Andréia e ao Seu Sérgio por sempre serem tão queridos.

Ao CNPq e à CAPES, pelo suporte financeiro concedido.

A todos (as) que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“The pain you feel today will be the strength you will feel tomorrow,
for every challenge encountered there is the opportunity for
growth.”*

Autor desconhecido.

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória do sistema nervoso central caracterizada pela desmielinização axonal dos neurônios presentes no cérebro e medula espinhal. Dentre as terapias modificadoras da doença disponíveis para o tratamento da EM, destaca-se o interferon-beta (IFN- β). O IFN- β é uma citocina da família dos interferons (IFNs) do tipo I com características atividades antivirais, antiproliferativas e imunomodulatórias. O IFN- β têm sido utilizado para o tratamento da EM há mais de 20 anos, mas apesar dos comprovados benefícios promovidos por sua utilização, o tratamento com IFN- β pela via subcutânea promove o desenvolvimento de dor e edema em pacientes com EM. Esses efeitos adversos apresentam significativo impacto sobre os pacientes com EM por promoverem redução na qualidade de vida assim como na adesão dos pacientes ao tratamento. Os mecanismos responsáveis por mediar a dor e o edema produzidos pela administração subcutânea do IFN- β são desconhecidos até hoje, e não existe descrito na literatura nenhum modelo animal que possa ser utilizado para investigar como o IFN- β induz tais efeitos adversos. Considerando o exposto, o presente estudo objetivou caracterizar um modelo animal de nocicepção e edema induzidos pela injeção subcutânea do IFN- β no qual se possa investigar os possíveis mecanismos responsáveis por mediar esses efeitos adversos. Animais machos adultos das linhagens C57BL/6-UFSC e A129S2/SvPas (Selvagem e IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-}) foram utilizados, e os experimentos foram conduzidos em blocos com a utilização de estratégias de randomização e cegamento. O IFN- β , assim como o IFN- α , foi avaliado quanto à sua capacidade de produzir efeitos hiperalgésicos (Limiares mecânicos e escores de guarda da pata pós-teste de von Frey) e edematogênico (aferição de espessura da pata injetada) após sua administração subcutânea em diferentes doses (1x10², 3x10², 1x10³ UI/sítio). Em comparação com o grupo veículo, animais que receberam IFN- β (1x10³ UI/sítio) desenvolveram hiperalgesia e edema de forma rápida e prolongada, enquanto o IFN- α promoveu os mesmos efeitos, mas de forma intermitente e menos intensa. Animais selvagens e IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-} também desenvolveram hiperalgesia e edema após a administração do IFN- β . Com exceção do inibidor de JAK1 (PF-04965842), que apresentou efeito anti-hiperalgésico parcial, as demais estratégias farmacológicas utilizadas (antagonistas TRPV1 e TRPA1, ablação de fibras TRPV1⁺/TRPA1⁺ com resiniferatoxina, inibidor de PKC, antagonista NMDAR, inibidor de canais HCN e estabilizador de mastócitos) não foram eficazes em prevenir os efeitos hiperalgésicos e edematogênico induzidos pela administração subcutânea do IFN- β .

Conjuntamente, esses dados demonstram a padronização de um modelo animal que pode ser utilizado para o estudo dos mecanismos responsáveis por mediar os efeitos adversos locais (dor e edema) promovidos pelo IFN- β administrado via subcutânea.

Palavras-chave: Doença autoimune, terapia modificadora, citocina, mecanismos, canais TRP.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous system autoimmune inflammatory disease characterized by the axonal demyelination of neurons present in the brain and spinal cord. IFN- β stands out among the disease-modifying therapies available for the treatment of MS. IFN- β is a cytokine belonging to the type I interferons (IFNs) family, which presents hallmark antiviral, antiproliferative and immunomodulatory activities. IFN- β has been used for the treatment of MS for more than 20 years, but despite the proven benefits from its use, IFN- β -based treatment through subcutaneous injection promotes the development of both pain and edema in MS patients. These adverse effects have a significant impact on MS patients as they reduce quality of life as well as compliance of patients to the IFN- β -based treatment. The mechanisms responsible for underlying the development of pain and edema upon subcutaneous injection of IFN- β remain unknown, and there is no animal model described in the literature that could be used to investigate how IFN- β promotes such adverse effects. Taking this into consideration, the present study aimed to characterize an animal model of both nociception and edema induced by the subcutaneous injection of IFN- β , in which the mechanisms responsible for mediating such adverse effects can be assessed. Adult male mice from the C57BL/6-UFSC and A129S2/SvPas (Wild-type and IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-}) lineages were used, and experiments were conducted in blocks with utilization of both randomization and blinding strategies. IFN- β , likewise IFN- α , was assessed regarding its potential to induce hyperalgesic effects (Mechanical threshold and paw guarding behavior score post-von Frey test) and edema following its subcutaneous injection in different doses (1x10², 3x10², 1x10³ IU/site; s.c.). When compared to the vehicle group, animals that received IFN- β (1x10³ IU/site) developed rapid and long-lasting hyperalgesia and edema, whilst IFN- α promoted the same effects, but in an intermittent and less intense fashion. Wild-type and IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-} animals also developed hyperalgesia and edema upon IFN- β administration. Except for the JAK1 inhibitor (PF-04965842), which produced a partial anti-hyperalgesic effect, other pharmacological strategies used (TRPV1 and TRPA1 antagonists, TRPV1⁺/TRPA1⁺ positive fibers with resiniferatoxin, PKC inhibitor, NMDAR antagonist, HCN channels inhibitor, mast cell stabilizer) were not able to prevent the hyperalgesic and edematogenic effects induced by the subcutaneous injection of IFN- β . Collectively, these data depict the standardization of an animal model that can be used for the study of the underlying mechanism responsible for mediating the local adverse effects (pain and edema) promoted by subcutaneously administered IFN- β .

Keywords: Autoimmune disease, modifying therapy, cytokine, mechanisms, TRP channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fármacos disponíveis para o tratamento da esclerose múltipla.....	32
Figura 2 – Ligação do IFN- β ao seu receptor e ativação da sinalização intracelular via JAK-STAT.....	38
Figura 3 – Diagrama do procedimento para aplicação de filamentos no teste de von Frey.....	51
Figura 4 – Desenho experimental I: investigação dos efeitos pró-nociceptivos e edematogênico do interferon-beta (IFN- β).....	57
Figura 5 – Desenho experimental II: investigação dos efeitos pró-nociceptivos e edematogênico do interferon-alfa (IFN- α).....	58
Figura 6 – Desenho experimental III: investigação do envolvimento do receptor de interferons do tipo I, IFN- $\alpha\beta$ R1, nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico do IFN- β	59
Figura 7 – Desenho experimental IV: investigação do papel da sinalização via JAK1 nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico do IFN- β	60
Figura 8 – Desenho experimental V: investigação da participação dos receptores TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia e edema causados pelo IFN- β	62
Figura 9 – Desenho experimental VI: investigação do envolvimento de neurônios sensoriais TRPV1 ⁺ /TRPA1 ⁺ na hiperalgesia e edema causados pelo IFN- β	63
Figura 10 – Desenho experimental VII: investigação de possíveis mecanismos alternativos envolvidos na hiperalgesia e edema causados pelo IFN- β	64
Figura 11 – Efeito pró-nociceptivo e edematogênico da administração subcutânea (s.c.) do interferon-beta (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ² , 3x10 ² e 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	68
Figura 12 – Efeito da administração subcutânea (s.c.) do interferon-alfa (IFN- α ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	70

Figura 13 – Amplificação dos fragmentos correspondentes para os camundongos A129S2/SvPas Selvagem (155 pb) e para os camundongos A129S2/SvPas (IFN- $\alpha\beta$ R1 ^{-/-}) (250 pb).....	72
Figura 14 – Efeito da administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem A129S2/SvPas (selvagem e <i>knockout</i> – IFN- $\alpha\beta$ R1 ^{-/-}).....	73
Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com inibidor de JAK1, PF-04965842 (10 μ l – 300 pmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênicas induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	75
Figura 16 – Efeito do pré-tratamento com antagonista TRPV1, SB-366791 (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênicas induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	77
Figura 17 – Efeito do pré-tratamento com antagonista TRPA1, HC-030031 (10 μ l – 3 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênicas induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	78
Figura 18 – Efeito da ablação prévia de neurônios sensoriais TRPV1 ⁺ /TRPA1 ⁺ com resiniferatoxina (RTX – 30, 70 e 100 μ g/kg; s.c.) sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	81
Figura 19 – Efeito do pré-tratamento com inibidor de PKC, GF-109203X (10 μ l – 0,3 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	83
Figura 20 – Efeito do pré-tratamento com antagonista NMDA, cetamina (10 μ l – 100 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-	

nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	85
Figura 21 – Efeito do pré-tratamento com inibidor de canais HCN, ivabradina (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	87
Figura 22 – Efeito do pré-tratamento com estabilizador de mastócitos, cromoglicato (10 μ l – 4nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10 ³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância (do inglês, *Analysis of variance*)
ARRIVE – Pesquisa Animal e Relato de Experimentos In Vivo (do inglês, *Animal Research and Reporting of In Vivo Experiments*)
ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês, *Adenosine Triphosphate*)
BI – Basal I
BII – Basal II
BSA – Albumina bovina sérica (do inglês, *Bovine serum albumin*)
C- – Controle negativo
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CFA – Adjuvante completo de Freund (do inglês, *Complete Freund's adjuvant*)
CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, *calcitonin gene-related peptide*)
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D0 – Dia zero
D1 – Dia um
DMSO – Dimetil-sulfóxido (do inglês, *Dimethyl sulfoxide*)
DNA – Ácido dioxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)
dNTPs – Deoxidonucleotídeos trifosfatados (do inglês, *phosphatated deoxynucleotides*)
DRG – Gânglio da raiz dorsal (do inglês, *dorsal root ganglion*)
E.P.M. – Erro padrão da média
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético (do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*)
EM – Esclerose múltipla
EMPP – Esclerose múltipla primária-progressiva
EMPR – Esclerose múltipla progressiva-recorrente
EMRR – Esclerose múltipla recorrente-remitente
EMSP – Esclerose secundária-progressiva
FDA – Administração de Drogas e Alimentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)
FMD – Fármaco modificador da doença

GAS – Sítio ativado por interferon-gama (do inglês, *interferon-gamma-activated site*)

HCN – Canais iônicos de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (do inglês, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*)

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*)

IFN – Interferon

IFN- α – Interferon-alfa (do inglês, *interferon-alpha*)

IFN- α 1/2 – Receptor de interferons do tipo I (do inglês, *Type-I interferons receptor*)

IFN- α 1 – Subunidade 1 do receptor de interferons do tipo I (do inglês, *Type-I interferons receptor subunit 1*)

IFN- α 2 – (do inglês, *Type-I interferons receptor subunit 2*)

IFN- β – Interferon-beta

IFN- γ – Interferon-gama (do inglês, *interferon-gamma*)

IL – Interleucina (do inglês, *interleukin*)

IL-1 – Interleucina-1 (do inglês, *interleukin-1*)

IL-1 β – Interleucina 1-beta (do inglês, *interleukin-1beta*)

IL-6 – Interleucina-6 (do inglês, *interleukin-6*)

IRF3 – Fator regulador de interferons tipo 3 (do inglês, *interferon regulatory factor 3*)

IRF7 – Fator regulador de interferons tipo 7 (do inglês, *interferon regulatory factor 7*)

IRF8 – Fator regulador de interferons tipo 8 (do inglês, *interferon regulatory factor 8*)

IRF9 – Fator regulador de interferons tipo 9 (do inglês, *interferon regulatory factor 9*)

IRFs – Fatores reguladores de interferon (do inglês, *Interferon regulatory factors*)

ISGF3 – Fator 3 de gene estimulado por interferon (do inglês, *interferon-stimulated gene factor 3*)

ISGs – Genes estimulados por interferon (do inglês, *interferon-stimulated genes*)

ISREs – Elementos de resposta estimulada por interferon (do inglês, *interferon-stimulated response elements*)

JAK – Janus quinase (do inglês, *janus kinase*)

JAK1 – Janus quinase 1 (do inglês, *janus Kinase 1*)

K⁺ – Íon potássio

LAFEX – Laboratório de Farmacologia Experimental
LIDI – Laboratório de Imunobiologia das Doenças Infecciosas
LPS – Lipopolissacarídeo (do inglês, *Lipopolysaccharide*)
MAPKs – Proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês, *mitogen-activated protein kinases*)
NaCl – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NF- κ B – Fator nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor kappa B*)
NGF – Fator de crescimento neuronal (do inglês, *Nerve growth factor*)
NKs – Exterminadoras naturais (do inglês, *Natural killers*)
NMDAR – Receptor N-metil-D-aspartato (do inglês, *N-methyl-D-aspartate receptor*)
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-associated molecular patterns*)
PB – Pares de base
PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase chain reaction*)
PGE2 – Prostaglandina E2 (do inglês, *prostaglandin E2*)
PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase (do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase*)
PKC – Proteína quinase C (do inglês, *protein kinase C*)
PM – Padrão de tamanho molecular
PPRs – Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês, *Pattern recognition receptors*)
RPM – Rotações por minuto
RTX – Resiniferatoxina (do inglês, *resiniferatoxin*)
S.C. – Subcutâneo (do inglês, *subcutaneous*)
SNC – Sistema Nervoso Central
STAT1 – Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 1 (do inglês, *signal transducer and transcription activator protein 1*)
STAT2 – Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 2 (do inglês, *signal transducer and transcription activator protein 2*)
STATs – Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (do inglês, *signal transducer and transcription activator proteins*)
TLR – Receptores do tipo Toll (do inglês, *toll-like receptors*)
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor- α*)

TRPA1 – Receptor de potencial transitório anquirina 1 (do inglês, *transient receptor potential ankyrin 1*)

TRPV1 – Receptor de potencial transitório vanilóide 1 (do inglês, *transient receptor potential vanilloid 1*)

TYK2 – Tirosina quinase 2 (do inglês, *tyrosine kinase 2*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UI – Unidades Internacionais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	29
1.2	TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	30
1.3	INTERFERONS (IFNs)	33
1.3.1	HISTÓRICO.....	33
1.3.2	TIPOS DE IFNs.....	34
1.3.3	IFNs DO TIPO I (IFN- β e IFN- α).....	35
1.4	DOR, EDEMA E IFN- β	39
2	HIPÓTESE.....	46
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	ANIMAIS.....	48
4.2	FÁRMACOS E REAGENTES.....	49
4.3	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NOCICEPTIVA E DE EDEMA.....	50
4.3.1	TESTE DE VON FREY – HIPERALGESIA MECÂNICA.....	50
4.3.1.2	TESTE DE VON FREY – COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO EVOCADO: ESCORE DE GUARDA DA PATA PÓS-VON FREY.....	51
4.3.2	MENSURAÇÃO DA ESPESSURA DA PATA – DESENVOLVIMENTO DE EDEMA.....	52
4.4	ABLAÇÃO DE NERVOS SENSORIAIS POR RESINIFERATOXINA(RTX).....	52
4.4.1	PERDA DE SENSIBILIDADE À CAPSAICINA – TESTE DE LIMPEZA DO OLHO.....	52
4.4.2	PERDA DE SENSIBILIDADE NOCICEPTIVA À ESTIMULO TÉRMICO FRIO – TESTE DA ACETONA.....	53
4.4.3	PERDA DE SENSIBILIDADE NOCICEPTIVA À ESTIMULO TÉRMICO QUENTE – TESTE DE HARGREAVES.....	53
4.5	GENOTIPAGEM DE CAMUNDONGOS 129S2/SvPas (selvagem e IFN- $\alpha\beta$ R1 ^{-/-}).....	54
4.5.1	ISOLAMENTO DO DNA TOTAL DA CAUDA DE CAMUNDONGOS.....	54

4.5.2	AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS GÊNICOS VIA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	54
4.6	DESENHOS EXPERIMENTAIS.....	55
4.6.1	EXPERIMENTO I – INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO INTERFERON-BETA (IFN- β).....	56
4.6.2	EXPERIMENTO II – INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO INTERFERON-ALFA (IFN- α).....	57
4.6.3	EXPERIMENTO III – INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE INTERFERONS DO TIPO I, IFN- α 1R1, NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β	58
4.6.4	EXPERIMENTO IV – INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA SINALIZAÇÃO VIA JAK1 NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β	59
4.6.5	EXPERIMENTO V – INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β	61
4.6.6	EXPERIMENTO VI – INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NEURÔNIOS SENSORIAIS TRPV1 ⁺ /TRPA1 ⁺ NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β	62
4.6.7	EXPERIMENTO VII – INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS ALTERNATIVOS ENVOLVIDOS NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β	63
4.7	DESTINO DOS ANIMAIS.....	65
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5	RESULTADOS.....	66
5.1	EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO INTERFERON-BETA (IFN- β).....	65
5.2	INTERFERON-ALFA (IFN- α) TAMBÉM APRESENTA EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO.....	69
5.3	O RECEPTOR DE IFN- β (IFN- α 1R1 ^{-/-}) NÃO ESTÁ ENVOLVIDO NOS EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β	71
5.4	O EFEITO PRÓ-NOCICEPTIVO DO IFN- β É PARCIALMENTE PREVENIDO COM A INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MEDIADA VIA JAK1.....	74

5.5	O PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTA TRPV1 E TRPA1 NÃO PREVINE A HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS POR IFN- β	76
5.6	A ABLAÇÃO DE NEURÔNIOS SENSORIAIS TRPV1 ⁺ /TRPA1 ⁺ PREVINE PARCIALMENTE OS EFEITOS HIPERALGÉSICOS DO IFN- β	79
5.7	A SINALIZAÇÃO VIA PKC NÃO ESTA ENVOLVIDA NOS EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β	81
5.8	OS EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICOS DO IFN- β NÃO SÃO PREVENIDOS PELO ANTAGONISMO DE RECEPTORES NMDA.....	84
5.9	A INIBIÇÃO DE CANAIS DO TIPO HCN NÃO PREVINE A HIPERALGESIA MECÂNICA NEM O EDEMA INDUZIDOS POR IFN- β	86
5.10.	A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NÃO ESTA ENVOLVIDA NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β	88
6	DISCUSSÃO.....	90
6.1	RECEPTOR DE INTERFERONS DO TIPO I (IFN- $\alpha\beta$ R1/2) E OS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β	93
6.2	A SINALIZAÇÃO MEDIADA VIA JAK1 NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β	95
6.3	MECANISMOS ALTERNATIVOS PARA EXPLICAR A HIPERALGESIA E EDEMA INDUZIDOS PELO IFN- β	96
6.4	PAPEL DOS RECEPTORES TRPV1, TRPA1 E DAS FIBRAS NOCICEPTIVAS NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β	99
7	CONCLUSÃO.....	102
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXO I.....	137

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A primeira descrição formal da esclerose múltipla (EM) foi feita em 1868 pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot, que ao observar pacientes com episódios intermitentes de disfunção neurológica relatou a presença de agregados de células inflamatórias perivasculares em meio à substância branca do cérebro e medula espinhal. A partir de sua observação, Jean-Martin denominou a condição de *sclérose en plaques disseminées*, ou esclerose múltipla (CHARCOT, 1868; HAFLER et al., 2005; POSER E BRINAR, 2004; RANSOHOFF et al., 2015).

A EM é uma desordem neurodegenerativa crônica, inflamatória e autoimune que atinge o sistema nervoso central (SNC) humano, sendo patologicamente caracterizada por um processo de desmielinização de fibras nervosas no cérebro e medula espinhal. Tal processo causa lesões na bainha de mielina das fibras nervosas e leva à uma progressiva falha ou total perda da comunicação entre o SNC e o resto do corpo, promovendo elevados níveis de incapacitação entre adultos jovens (DAWSON, 1916; FROHMAN et al., 2006; NOSEWORTHY et al., 2000; RANSOHOFF et al., 2015).

Do ponto de vista epidemiológico, estima-se que, mundialmente, 2,5 milhões de pessoas sejam afligidas pela EM (COMPSTON AND COLES, 2008). Existe uma maior prevalência da doença em regiões de clima temperado e de população caucasiana como nos países da América do Norte e do Norte da Europa, assim como no Oriente Médio. De fato, a prevalência de EM nos Estados Unidos pode variar entre 250 a 350,000 pacientes (KOUTSOURAK et al., 2010; MORTAZAVI et al., 2012; NOSEWORTHY et al., 2000). No Brasil, os dados epidemiológicos sobre a EM são bastante incipientes, contudo, o perfil de prevalência nacional parece ser correspondente às regiões que apresentam alta prevalência de EM, como a região sul (VASCONCELOS et al., 2016). Mulheres são muito mais acometidas pela doença que homens, com proporções variando entre 2-3:1. O diagnóstico da EM traz consigo um grande fardo sócio-econômico, uma vez que acomete adultos jovens com idade média de 30 anos (faixa etária de 20-40 anos, economicamente ativa) causando altos índices de incapacidade física, elevados gastos com tratamento, além de sofrimento individual e familiar devido ao prolongado curso da doença (BROWNLEE et al., 2016; COMPSTON

AND COLES, 2008; DENDROU et al., 2015; RANSOHOFF et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2016).

A neurodegeneração causada pelo característico processo de desmielinização na EM favorece o aparecimento de sinais e sintomas bastante heterogêneos, que basicamente refletem os danos causados em diferentes regiões do SNC, assim como sua intensidade. Pacientes acometidos pela EM podem apresentar distúrbios visuais (visão embaçada e diplopia), sensoriais (parestesia e hipoestesia), prejuízos motores (perda de coordenação e equilíbrio), disfunção sexual, déficits cognitivos, fadiga e dor (DENDROU et al., 2015; ROXBURGH et al., 2005).

O diagnóstico precoce e preciso da EM é fundamental para que a melhor estratégia terapêutica seja adotada. Nesse sentido é preciso considerar os sinais e sintomas que o paciente apresenta no momento da avaliação, assim como a evolução temporal dos achados clínicos, que de forma conjunta vão contribuir para um correto diagnóstico. Portanto, o diagnóstico é feito com base no histórico, sinais e sintomas clínicos do paciente, achados de ressonância magnética cerebral e medular (sensível para detecção de lesões no SNC), avaliação laboratorial do líquido, e avaliação de potenciais evocados (visual, auditivo e somatosensorial) (BROWNLEE et al., 2016; KORNEK et al., 2012; MILLER et al., 2008; NOSEWORTHY et al., 2000; POLMAN et al., 2011).

As estratégias diagnósticas utilizadas permitem ainda classificar a EM em quatro categorias: EM recorrente-remitente (EMRR) ou surto-remissão; EM primária-progressiva (EMPP); EM secundária-progressiva (EMSP); e EM progressiva-recorrente (EMPR). EMRR é a principal forma de esclerose múltipla com cerca de 85 a 90% dos diagnósticos. A EMRR é caracterizada pela ocorrência de uma disfunção neurológica desencadeada por surtos (recidivas ou exacerbações) sintomáticos abruptos que são seguidos por um período de remissão clínica onde se observa melhora ou até desaparecimento de sintomas. Os surtos acontecem de forma intermitente a cada 2 anos e podem durar por pelo menos 24 horas quando na ausência de febre ou infecção. O curso dos períodos de recuperação após um surto é variável e pode ser incompleto (BROWNLEE et al., 2016; DENDROU et al., 2015; LUBLIN et al., 2014; RANSOHOFF et al., 2015; POLMAN et al., 2011).

1.2 TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

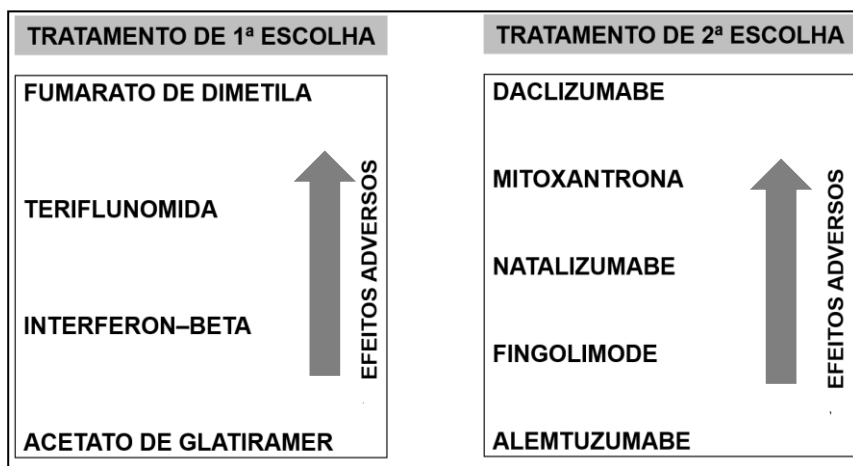
Assim como em muitas outras doenças crônicas, ainda não há cura para a esclerose múltipla. Dessa forma, o seu tratamento é focado na recuperação pós-ataques/exacerbações, redução da frequência dos ataques modificando assim o curso da doença, além do manejo dos sintomas para melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Em alguns raros casos, é possível observar pacientes que apenas tratam a doença em si, uma vez que apresentam ou não poucos e leves sintomas associados (COMI et al., 2016; HAVRDOVA et al., 2010; LUBLIN et al., 2014).

As alternativas farmacológicas aprovadas, por órgãos reguladores internacionais como o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos, para o tratamento da EM são conhecidas como fármacos/tratamentos modificadores da doença (FMDs) e são principalmente empregadas no tratamento da EMRR. Esses FMDs também podem ser utilizados como opção terapêutica nas formas progressivas da EM onde os pacientes apresentam recorrências (COLES et al., 2006; COMI et al., 2016; HAUSER et al., 2013; TORKILDSEN et al., 2015). Os tratamentos disponíveis para a EM podem ser divididos em tratamentos de primeira escolha (interferon-beta, acetato de glatiramer, fumarato de dimetila e teriflunomida), e tratamentos de segunda escolha (natalizumabe, fingolimode e alemtuzumabe, daclizumabe e mitoxantrona), conforme mostrado na Figura 1. Estas opções terapêuticas se encontram disponíveis aos pacientes em apresentações injetáveis pelas vias subcutânea, intramuscular e intravenosa, e apresentações para uso oral (COMI et al., 2016; TORKILDSEN et al., 2015).

Dentre as opções terapêuticas para uso injetável pela via subcutânea e de interesse para o presente estudo, destaca-se o interferon-beta (IFN- β). O IFN- β , uma citocina imunomodulatória, foi a primeira opção terapêutica aprovada em 1996 para o tratamento da esclerose múltipla, pois no início dos testes se acreditava que a EM tinha uma patogenia viral. O IFN- β foi mostrado como sendo capaz de reduzir a progressão da doença, assim como a incapacidade física associada, uma vez que até então o tratamento era focado apenas no controle paliativo dos sintomas da doença e das exacerbações agudas (JACOBS et al., 1995, 1996; THE IFN β MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP, 1993). Os mecanismos pelos quais o IFN- β exerce seus efeitos terapêuticos na esclerose múltipla são complexos e ainda não foram totalmente elucidados. Contudo, sabe-se que ele promove aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias ao mesmo tempo que reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, eleva a produção do fator de crescimento

neuronal (do inglês, NGF) no SNC e reduz a migração de células inflamatórias transbarreira hematoencefálica. Conjuntamente, esses efeitos promovem redução de morte neuronal e aumento da capacidade regenerativa dos neurônios (CROZE et al., 2013; DHIB-JALBUT E MARK, 2010; KASPER E REDER, 2014; KIESEIER, 2011).

Figura 1 – Fármacos disponíveis para o tratamento da esclerose múltipla.



Fonte: Adaptado de Torkildsen et al. (2016)

Atualmente, existem disponíveis quatro apresentações farmacêuticas do IFN- β para o tratamento da esclerose múltipla através de administração pela via subcutânea: Betaseron® (0,25 mg; uma vez a cada dois dias), Extavia® (0,25 mg; uma vez a cada dois dias), Plegridy® (125 μ g; uma vez a cada 14 dias), Rebif® (22 ou 44 μ g; três vezes por semana). O IFN- β apresenta cerca de 27-30% de biodisponibilidade após administração subcutânea, com uma meia-vida de aproximadamente 10h, sendo metabolizado pela via hepática e eliminado pela via renal (BUCHWALDER et al., 2000; GEORGE et al., 2012; HU et al., 2016; KAGAN et al., 2010). Os principais efeitos adversos agudos associados com a utilização do IFN- β nessas apresentações são: sintomas tipo-gripe (calafrios, febre, mialgia, fadiga e fraqueza), dor de cabeça, e reações no local da injeção (edema, eritema e dor). Os sintomas tipo-gripe se manifestam após a administração do IFN- β e podem perdurar por até 24 horas, ou ainda persistir de forma intermitente após cada injeção por alguns meses, até que pacientes desenvolvam uma certa tolerância a esses efeitos

adversos. As reações adversas no local da injeção comumente aparecem logo após a administração do IFN- β , podendo durar por apenas alguns minutos, ou ainda se prolongar por até 24 horas, apresentando pico de resposta entre 30 a 60 minutos após a injeção (HARRIS et al., 2005; SINGER et al., 2012).

Apesar do tratamento com IFN- β em pacientes com esclerose múltipla ser de maneira geral bem tolerado, esses efeitos adversos contribuem de forma significativa para a redução da qualidade de vida dos pacientes, assim como para uma menor adesão ao tratamento, principalmente entre os primeiros 3-6 meses do início da terapia (ARNOLDUS et al., 2000; BALAK et al., 2012; O'CONNOR et al., 2008; FOLEY et al., 2013; GOTTBORG ET AL., 2000; KÜMPFEL et al., 2007; MOHR et al., 1998; NEILLEY et al., 1996; PANITCH et al., 2002; PORTACCIO E AMATO, 2016; RINTALA et al., 2016; SIMONE et al., 2006; WALTHER E HOHLFELD, 1999). No estudo realizado por Freedman (2011), foi verificado que esses efeitos adversos acometem cerca de 44-74% dos pacientes que fazem uso do IFN- β pela via subcutânea, dos quais cerca de 2% abandonam a terapia. Recomenda-se como tratamento para esses sintomas a utilização de anti-inflamatórios como acetaminofeno, ibuprofeno, ou corticosteróides em baixas doses no caso de sintomas tipo-gripe, e anestésicos locais como lidocaína e prilocaína (EMLA®) no caso de reações no local da injeção. Contudo, ainda há pacientes que não respondem a essas alternativas terapêuticas de prevenção e controle dos sintomas tipo-gripe e reações no local da injeção (BAUM et al., 2007; BUHSE, 2006; FOLEY et al., 2013; LEUSCHEN et al., 2004; PORTACCIO E AMATO, 2009; REESS et al., 2002; RÍO et al., 1998). Dessa forma, é importante que estudos que investiguem os mecanismos responsáveis pela mediação desses efeitos adversos sejam realizados com o intuito de que sejam propostas alternativas de tratamento mais efetivas, e assim seja possível melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir os níveis de não-adesão à terapia com IFN- β .

1.3 INTERFERONS (IFNs)

1.3.1 HISTÓRICO

Existem evidências na literatura da presença de interferons, citocinas com predominante atividade antiviral, em peixes durante o período Devoniano, há mais de 400.000.000 de anos. Acredita-se que os peixes foram os seres que mais se diferenciaram em outros vertebrados, e mudanças na sua composição proteica, principalmente relacionada aos IFNs, parece ter evoluído de forma conjunta com a diversidade taxonômica. As similaridades

observadas entre interferons humanos e interferons de peixes com relação às suas sequências de aminoácidos e estrutura, sugere a presença de um organismo que foi um ancestral comum entre peixes e mamíferos. A importância de IFNs para a biologia humana foi primeiramente descrita há 60 anos (REDER E FENG, 2013).

Na década de 1950, existia o conhecimento científico solidificado de que células já infectadas com algum vírus apresentavam resistência à infecção por outros vírus, dando a ideia de que existia algum mecanismo que mediava a capacidade de um vírus regular, ou interferir, com o potencial infectante de outro (HENLE, 1950). Em 1957, Isaacs e Lindenmann (1957), sabendo desse potencial de “interferência” existente entre vírus, realizaram experimentos de infecção de membranas corioalantóides com o vírus da gripe Influenza A, e denominaram a substância com capacidade de interferência viral de interferon (IFN). Estudos bioquímicos realizados por Lengyel (1982) evidenciaram o IFN como uma substância proteica pequena, que era produzida e também secretada a partir das células em resposta a um processo de sinalização celular desencadeado pela interação entre padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, PAMPs) com receptores de reconhecimento de padrão (do inglês, PRRs) (ISAACS et al., 1957; WU E CHEN, 2014)

Posteriormente, estudos realizados com glóbulos brancos humanos e de primatas mostraram que essas células também eram capazes de produzir e secretar IFN. Os avanços alcançados no desenvolvimento de técnicas de purificação e isolamento de proteínas, permitiram, cerca de 20 anos mais tarde, uma melhor caracterização das propriedades bioquímicas do IFN, assim como a identificação do IFN não mais como uma única molécula, mas sim como uma família de proteínas, com três classes representativas de IFN (CANTELL et al., 1981a, 1981b; KNIGHT, 1975; MAEDA et al., 1980; PESTKA, 2007; RUBINSTEIN et al., 1981; SCHNEIDER et al., 2014).

1.3.2 TIPOS DE IFNs

Atualmente, IFNs são conhecidos como uma família de citocinas que exercem atividades antivirais, antiproliferativas e imunomodulatórias em prol da proteção do organismo (ISAACS E LINDENMANN, 1997; WEERD et al., 2013; PESTKA, 2007). A família de IFNs está dividida em três diferentes classes: IFNs do tipo I, do tipo II ou do tipo III. Em humanos e camundongos,

IFNs do tipo I compreendem por sua vez a classe de IFNs do tipo alfa (IFN- α) com 13 subtipos (IFN- α 1, - α 2, - α 4, - α 5, - α 6, - α 7, - α 8, - α 10, - α 13, - α 14, - α 16, - α 17 e - α 21), IFN- β , IFN ϵ , IFN κ e IFN ω . Os genes que codificam a expressão de IFNs do tipo I em humanos e camundongos estão alocados nos cromossomos 9 e 4, respectivamente (CHEN et al., 2004; GONZÁLEZ-NAVAJAS et al., 2012; PESTKA et al., 1987, 2004; PLATANIAS, 2005; SCHEINDER et al., 2014; WEERD E NGUYEN, 2012). A classe de IFNs do tipo II conta com apenas um representante que é o IFN- γ , dotado de pouca homologia estrutural com IFNs do tipo I e sendo codificado pelo gene localizado nos cromossomos 12 e 10 de humanos e camundongos, respectivamente (BACH et al., 1997; SCHEINDER et al., 2014; SCHRODER et al., 2004; WALTER et al. 1995). A terceira classe de IFNs, mais recentemente descoberta e anteriormente conhecida como moléculas tipo IFN, é representada pelos IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 (também chamados de IL-29, IL-28A e IL28B, respectivamente). IFNs do tipo III diferem bastante das outras duas classes, apresentando maior homologia com membros da família de citocinas IL-10, mas apresentam a característica atividade antiviral de IFNs preservada (ISAACS E LINDENMANN, 1997; KOTENKO et al., 2003; PESTKA et al., 2004; SCHEINDER et al., 2014; SHEPPARD et al., 2003).

1.3.3 IFNs DO TIPO I (IFN- β e IFN- α)

IFNs do tipo I, especialmente IFN- β e IFN- α , são produzidos durante uma resposta imune inata pela estimulação de PRRs, como receptores do tipo toll (do inglês, Toll-like receptors; TLR), mediada por PAMPs derivados de vírus, bactérias e parasitas. Essa ativação de PRRs induz o recrutamento de diversas vias de transdução de sinal que promovem a ativação de fatores reguladores de IFN (do inglês, IRFs), uma família de fatores de transcrição, que por sua vez estimulam a produção de IFNs do tipo I, como IFN- β e IFN- α (- α 1 em humanos e - α 4 em camundongos) (GEORGE et al., 2012; IVASHKIV E DONLIN, 2014; IWASAKI, 2012; MEDZHITOV, 2001; TRINCHIERI, 2010; WEERD et al., 2013). É válido ressaltar que essa produção ocorre de forma diferenciada entre IFN- β e IFN- α . Isso ocorre devido à presença de outros componentes, que não sítios para ligação de IRFs, no promotor do IFN- β (*ifnb*), como sítios para o fator nuclear kappa B (do inglês, NF- κ B), que permitem a produção de IFN- β em circunstâncias diferentes daquelas onde o IFN- α é produzido. Por exemplo, no caso do NF- κ B, o IFN- β é o único IFN produzido em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, devido à ativação de IRF3 e NF- κ B pela via de sinalização do TLR4 (DER et al., 1998; GESSANI et al., 1989; WEERD et al., 2013).

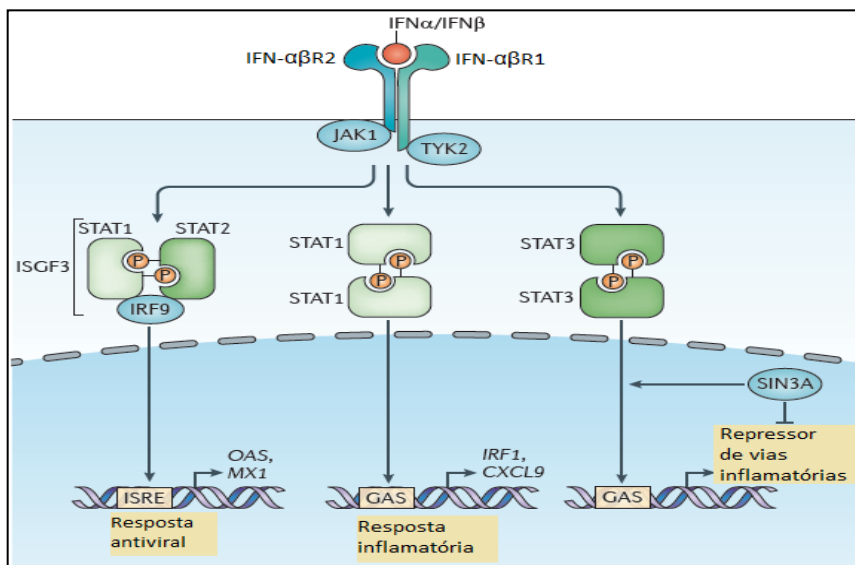
IFNs do tipo I podem ser produzidos por virtualmente todos os tipos celulares, incluindo leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e neurônios. Contudo, existe a necessidade de um tipo celular que seja especializado na produção de grandes quantidades de IFNs, o qual também é necessário para a eliminação, mediada por células exterminadoras naturais (do inglês, NKs), de células infectadas por vírus. Essas células que naturalmente produzem IFNs são conhecidas como células dendríticas plasmocitóides. Essa maior produção de IFNs do tipo I pode ser regulada por células da imunidade inata, como macrófagos e outras células dendríticas que quando estimuladas pelos próprios IFNs têm seu potencial de apresentação de antígenos aumentado levando à maior produção de IFNs, assim como à produção de outros mediadores da resposta imune (citocinas e quimiocinas) (ASSELIN-PATUREL et al., 2001; BARNES et al., 2002; HERTZOG et al., 2011; HERTZOG E WILLIAMS, 2013; IVASHKIV E DONLIN, 2014; MEDZHITOV, 2001; MacMICKING, 2012; TRINCHIERI E SANTOLI, 1978). Além disso, a produção de IFNs do tipo I, como IFN- α e IFN- β , pode também ser regulada de forma autócrina pela ligação de IFNs ao seu receptor com consequente ativação de sua cascata de sinalização intracelular, levando à fosforilação de IRF3, IRF7 e IRF8 e indução da expressão dos genes que codificam IFN- β e IFN- α (IVASHKIV E DONLIN, 2014; MARIÉ et al., 1998; PLATANIAS, 2005; TAILOR et al., 2007; TRINCHIERI, 2010).

IFN- β e IFN- α , assim como os demais IFNs do tipo I, exercem suas atividades antivirais, antiproliferativas e imunomodulatórias mediante ligação com seu receptor específico, o receptor de IFNs do tipo I (IFN- $\alpha\beta$ R1/2), que leva à ativação de uma cascata de sinalização intracelular mediada pela clássica via da família de proteínas janus quinase (do inglês, JAK) e das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (do inglês, STATs) (Figura 2). Essa ligação ao IFN- $\alpha\beta$ R1/2 acontece apesar da baixa homologia (~30%) que os IFNs do tipo I compartilham com relação às suas sequências aminoacídicas (PLATANIAS, 2005; BORDEN et al., 2007; LAMKEN et al., 2005; STARK E DARNELL, 2012; O'SHEA et al., 2015).

O IFN- $\alpha\beta$ R1/2 é um complexo heterodimérico composto pelas cadeias IFN- $\alpha\beta$ R1 (subunidade 1) e IFN- $\alpha\beta$ R2 (subunidade 2). Cada uma das subunidades apresenta interação com uma proteína da família das proteínas JAK. IFN- $\alpha\beta$ R1 está constitutivamente associada à tirosina quinase 2 (do inglês, TYK2), enquanto IFN- $\alpha\beta$ R2 se encontra ligada à JAK1 (Figura 2). O processo de sinalização clássico via JAK-STAT se inicia após a ligação do

IFN- β , ou qualquer outro IFN do tipo I, ao IFN- $\alpha\beta$ R1/2. A ligação provoca mudanças conformacionais nas duas subunidades, as quais se dimerizam levando à autofosforilação e ativação de suas TYK2 e JAK1 conjugadas, que por sua vez procedem com a fosforilação e ativação de STATs. No caso do IFN- β , STAT1 e STAT2 são fosforiladas e formam heterodímeros que por sua vez interagem com o fator regulador de IFN tipo 9 (do inglês, IRF9), formando complexos denominados de fator 3 de gene estimulado por IFN (do inglês, ISGF3). Os complexos ISGF3 são então translocados para o núcleo da célula, onde vão se ligar aos elementos de resposta estimulada por IFN (ISREs) contidos no DNA, e iniciar o processo de transcrição gênica. Além disso, também pode ocorrer a formação de homodímeros de STAT1 (STAT1-STAT1) que quando translocados para o núcleo irão interagir com elementos de sítio ativado por IFN- γ (do inglês, GAS) presentes na região promotora de alguns genes estimulados por interferon (do inglês, ISGs) e também dar início à transcrição gênica. STATs1-6 podem ser ativadas em resposta à ligação de IFNs do tipo I no seu receptor, e formar uma variedade de homo e heterodímeros que vão se complexar a IRFs e interagir no núcleo das células com ISREs e GAS dos diversos ISGs existentes, regulando a expressão de uma infinidade de genes, que vão mediar os efeitos pleiotrópicos dos IFNs do tipo I como o IFN- β (DARNELL et al., 1994; DARNELL, 1998; DER et al., 1997; GEORGE et al, 2012; GONZÁLEZ-NAVAJAS et al., 2012; MAJOROS et al., 2017; PETSKA et al., 2004; PLATANIAS, 2003, 2005; SCHNEIDER, 2014).

Figura 2 – Ligação do IFN- β ao seu receptor e ativação da sinalização intracelular via JAK-STAT.



Fonte: Adaptado de Ivashkiv e Donlin (2014).

Assim como os IFNs apresentam uma ampla expressão pelo organismo, o IFN- $\alpha\beta$ R1/2 pode ser expresso em todos os órgãos, tecidos e em uma grande gama de linhagens celulares, o que favorece seus efeitos pleiotrópicos a partir de sua ativação pela ligação de interferons do tipo I como o IFN- β . Nesse sentido, outras vias de sinalização podem ser utilizadas pelos IFNs do tipo I para que os mesmos possam mediar seus efeitos no organismo. Entre as vias alternativas que podem estar envolvidas na sinalização mediada por IFNs do tipo I, como o IFN- β , é possível destacar: a sinalização mediada por proteína quinase C (PKC), sinalização via proteínas CRK, a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês, MAPKs) e a via da fosfatidilinositol-3-quinase (do inglês, PI3K). Essa multiplicidade de vias de sinalização que podem ser recrutadas pelos IFNs do tipo I pode também explicar o potencial terapêutico identificado nessas citocinas, que têm sido utilizadas para o tratamento de diversas condições clínicas como: esclerose múltipla (IFN- β), hepatites crônicas dos tipos B, C e D (IFN- α), leucemia mielóide crônica e carcinoma de células renais (IFN- α), doença granulomatosa crônica e osteopetrose (IFN- α) (GEORGE et al., 2012;

HURTADO-GUERRERO et al., 2017; JAECKEL et al., 2001; PERRILLO, 2009; PESTKA, 2007; PLATANIAS, 2005; TALPAZ et al., 2013; WEERD et al., 2013). Não obstante, os efeitos adversos agudos, assim como os crônicos, e associados ao tratamento com o IFN- β , como sintomas do tipo-gripe e reações no local da injeção (dor e edema) poderiam estar sendo mediados tanto pela sinalização clássica via JAK-STAT quanto pelas vias alternativas mencionadas acima, ou ainda por interações do IFN- β com outros tipos de receptores (GEORGE et al., 2012; PLATANIAS, 2005; WEERD et al., 2013; WEERD E NGUYEN, 2012).

1.4 DOR, EDEMA E IFN- β

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, IASP), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real, ou potencial; ou descrita em termos de tal dano” (LOESER E TREEDE, 2008). Evidências na literatura sugerem que milhões de pessoas sofrem com processos dolorosos em todo o mundo, sendo a dor uma das principais razões que motiva a busca por cuidados médicos, a utilização de fármacos, redução na qualidade de vida de pacientes com doenças crônicas (incluindo dor crônica), assim como redução da adesão a tratamentos farmacológicos onde a dor é um importante efeito adverso (ATKINS et al., 2014; COUSINS E LYNCH 2011; KING E FRASER, 2013).

Dor no local da injeção, assim como edema (extravasamento plasmático e acúmulo de líquido no tecido), são uma das principais reações adversas observadas por pacientes que fazem uso de IFN- β pela via subcutânea para o tratamento da esclerose múltipla. De fato, vários estudos já identificaram essas reações adversas como importantes causas de redução na qualidade de vida dos pacientes com esclerose múltipla, principalmente entre os primeiros 3-6 meses a partir do início do tratamento, assim como redução na adesão dos pacientes à utilização de IFN- β , sendo motivo para redução das doses utilizadas ou até mesmo substituição de terapia (AGASHIVALA et al., 2013; ARNOLDUS et al., 2000; BALAK et al., 2012; BAUM et al., 2007; BEER et al., 2011; COMI et al., 2008; CLERICO et al., 2007; DEVONSHIRE et al., 2011; FOLEY et al., 2013; HARRIS et al. 2005; KLAUER E ZETTL, 2008; MENZIN et al., 2013; O'ROURKE E HUTCHINSON, 2005; PANITCH et al., 2002; PORTACCIO E AMATO, 2009; PRISMS, 1998; SINGER et al., 2012; TREADAWAY et al, 2009).

O desenvolvimento de dor e edema desencadeados pelo tratamento com IFN- β comumente ocorre logo após a injeção, podendo durar por apenas alguns minutos, ou ainda se prolongar por até 24 horas e apresentando pico de resposta entre 30 a 60 minutos após a injeção (HARRIS et al., 2005; SINGER et al., 2012). Há relatos na literatura de pacientes que descrevem a dor produzida pela administração do IFN- β como uma dor em queimação, e além disso, pacientes podem apresentar não só dor espontânea, mas também dor evocada como hiperalgesia mecânica cutânea, geralmente atribuídas a um processo inflamatório local (BUTTMANN et al., 2004; FOLEY et al., 2013; JANKOVIC, 2010; KOLB-MÄURER et al., 2015; O'CONNOR et al., 2008; OREFICE et al., 2016; PANITCH et al., 2002; WALTHER E HOHFELD, 1999). Apesar da administração subcutânea permitir o acesso do IFN- β à vários tipos celulares que expressam IFN- $\alpha\beta$ R1/2 e estão envolvidos com o desenvolvimento de dor e edema (p.ex. neurônios sensoriais, células endoteliais, mastócitos, fibroblastos) (GONZÁLEZ-NAVAJAS et al., 2012; PLATANIAS, 2005; STARK et al., 1998; WEERD E NGUYEN, 2012), não se conhecem os exatos mecanismos relacionados à dor e ao edema induzidos pelo IFN- β .

O processo de percepção de estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e químicos) que pode culminar, em humanos, em uma resposta dolorosa é denominado de nocicepção (também em animais). A nocicepção é mediada por células especializadas denominadas de nociceptores. Os nociceptores pertencem a basicamente duas classes de fibras sensoriais, as fibras do tipo A δ e do tipo C. Fibras A δ são responsáveis pela transdução de estímulos térmicos e mecânicos, e o fazem com velocidade média devido à sua fina mielinização, o que permite mediar respostas dolorosas de forma mais rápida. As fibras C também são chamadas de polimodais por sua capacidade de transdução para estímulos de diferentes naturezas (mecânicos, térmicos e químicos), a qual acontece de forma mais lenta devido à não mielinização axonal dessas fibras. A capacidade de transdução dos nociceptores é regulada por diferentes receptores que se encontram co-expressos na membrana dessas células (APKARIAN et al., 2005; BASBAUM et al., 2009; DUBIN E PATAPOUTIAN, 2010; JULIUS E BASBAUM, 2001; SHERRINGTON, 1906; VAY et al., 2012; WOOD E PERL, 1999; WOOLF E MA, 2007). Considerando os efeitos adversos (dor em queimação, hiperalgesia mecânica cutânea e edema) apresentados pelos pacientes com esclerose múltipla devido ao tratamento subcutâneo com IFN- β , pode-se supor que estes poderiam estar sendo mediados pela ativação de fibras sensoriais que expressam os receptores de

potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1).

Receptores TRPV1, assim como os receptores TRPA1, são canais de cátions não-seletivos amplamente envolvidos na transdução de uma grande variedade de estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e químicos) e mediação de respostas dolorosas em diversas condições. O receptor TRPV1 é caracteristicamente conhecido por mediar a sensação de queimação em resposta à estimulação com capsaicina (vanilóide pungente da pimenta) e poderia, portanto, estar sendo ativado e promovendo a sensação de dor em queimação após a administração do IFN- β . De fato, citocinas como a IL-1 β já foram mostradas como sendo capazes de diretamente ativar ou regular ativação dos receptores TRPV1. Além disso, receptores TRPA1 já foram caracterizados como sendo importantes transdutores de estímulos mecânicos, capazes inclusive de desencadear respostas hiperalgênicas, principalmente em condições inflamatórias (inflamação neurogênica) (BASBAUM et al., 2009; CATERINA et al., 1997, 2000; DUBIN E PATAPOUTIAN, 2010; GEPPETI et al., 2008; HINMAN et al., 2006; JULIUS, 2013; STORY et al., 2003; TÓTH et al., 2014; VAY et al., 2012). Nessas condições, ocorre a liberação de neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – do inglês, CGRP) a partir de fibras nociceptivas e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL1- β , IL-6, TNF- α) por células do sistema imune (residentes e recrutadas para o local da inflamação) que contribuem de forma conjunta para a sensibilização dos nociceptores e instalação de hiperalgesia (exacerbação de resposta dolorosa frente a estímulos nocivos), assim como para a produção de edema, o qual é desencadeado pelo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático com acúmulo de líquido tecidual. De maneira interessante, a ablação de fibras sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ através da administração de doses crescentes de resiniferatoxina (RTX), potente agonista TRPV1, já foi demonstrada como sendo uma estratégia eficaz na prevenção de hiperalgesia e edema em modelos animais de inflamação neurogênica (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; CATERINA et al., 1997, 2000; FERNANDES et al., 2011; JORDT et al., 2004; McMAHON et al., 2015; McNAMARA et al., 2007; PINHO-RIBEIRO et al., 2017; OBREJA et al., 2002; RIOL-BLANCO et al., 2014).

Estudos na literatura já demonstraram que ambas subunidades do receptor do IFN- β , IFN- $\alpha\beta$ R1/2, encontram-se expressas em fibras nociceptivas TRPV1⁺, inclusive no gânglio da raiz dorsal (do inglês, DRG) e medula espinhal, tanto de humanos quanto de ratos e camundongos (GOSWAMI et al., 2014; LIU et al., 2016; TRÄNKNER et al., 2014). A dor no

local da injeção, como um efeito adverso relacionado a vários fármacos, já foi atribuída à ativação de receptores e TRPV1 e TRPA1 (FISCHER et al., 2010; SCHILLERS et al., 2016). Além disso, pacientes que apresentam polimorfismos no gene que codifica a expressão do receptor TRPV1 parecem ter maior propensão ao desenvolvimento de dor após a injeção de IFN- β (BUTTARI et al., 2017).

Alternativamente, outros mecanismos poderiam estar envolvidos na mediação da dor e edema promovidos pela administração subcutânea do IFN- β . De fato, existem evidências na literatura de que as vias da proteína quinase C (do inglês, PKC) e dos canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN) estão envolvidos na regulação de excitabilidade neuronal induzida por IFN- β em neurônios do sistema nervoso central (BIEL et al., 2009; GOUGH et al., 2008; REETZ et al., 2014; REDIG et al., 2009; TSANTOULAS et al., 2016; WAXMAN E ZAMPONI, 2014).

A ativação de proteína quinase C, uma família de serina/treonina quinases, é um dos mecanismos pelos quais estímulos nocivos podem causar hiperalgesia. De fato, existem evidências da expressão de PKC em sítios de regulação do processo nociceptivo como: em neurônios aferentes primários, no corno dorsal da medula espinal, nas lâminas superficiais da medula espinal; assim como, em regiões supraespinais responsáveis pelo processamento de estímulos nociceptivos em dor, como a amígdala, ou do sistema descendente de analgesia, como a substância cinzenta periaquedutal. Além disso, tanto estudos *in vitro* quanto *in vivo* já demonstraram os efeitos pró-nociceptivos da ativação de PKC e os efeitos antinociceptivos dos inibidores de PKC, principalmente por processos de sensibilização periférica, mas também de sensibilização central (FERREIRA et al., 2005; VELÁZQUEZ et al., 2007; ZHAO et al., 2011).

Canais HCN (HCN1-4) apresentam homologia estrutural aos canais de potássio, mas com menor seletividade aos íons K⁺, o que lhes confere a capacidade de produzir uma corrente de influxo despolarizante quando estão ativos no potencial de repouso das membranas neuronais, e Dessa forma promovem aumento da excitabilidade neuronal, um fator importante na transmissão de informações nociceptivas e no desenvolvimento de hiperalgesia (TSANTOULAS et al., 2016). De fato, esses canais HCN se encontram expressos em neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico, com destaque para canais HCN2, encontrados em abundância em fibras nociceptivas do tipo C e A δ (ACOSTA et al., 2012; CHO et al., 2009; EMERY et al., 2011; KOURANOVA et al., 2008; TU et al., 2004); assim como para canais

HCN3, amplamente distribuídos em neurônios do DRG (CHAPLAN et al., 2003; KOURANOVA et al., 2008; TIBBS et al., 2016; WENG et al., 2012).

Adicionalmente, dados reportados na literatura evidenciam o potencial de IFNs do tipo I em modular a atividade dos receptores de glutamato tipo NMDA (NMDAR) no sistema nervoso central (Di FILIPPO et al., 2016; KESSING E TYOR, 2015). Os receptores de NMDA são receptores inotrópicos ativados por ácido glutâmico (glutamato) e NMDA com importante participação em processos nociceptivos tanto agudos quanto crônicos, assim como no desenvolvimento de hiperalgesia (BLEAKMAN et al., 2006; LARSSON e BROMAN, 2011; LIU et al., 2008; DU et al., 2003). Apesar do destaque que é dado ao papel de NMDAR na sensibilização central para a instalação e manutenção de estados de dor crônica, o NMDAR também participa da sensibilização periférica desencadeada por processos inflamatórios e dor aguda persistentes (BASBAUM et al., 2009). De fato, tanto o glutamato quanto o NMDA, quando injetados na pata de ratos e camundongos induzem hiperalgesia, enquanto antagonistas do NMDAR promovem efeitos anti-hiperalgésicos. De maneira interessante, a administração intraplantar de glutamato em camundongos também favorece o desenvolvimento de edema (BEIRITH et al., 2002; CAO et al., 2014; DU et al., 2003; FERRARI et al., 2014; LARSSON e BROMAN, 2011). Não obstante, a cetamina, um antagonista NMDA, apresenta, além de seus efeitos na indução e manutenção de anestesia, efeito anti-hiperalgésico em modelos animais de dor inflamatória (ROMERO E DUARTE, 2013). A cetamina também é utilizada na clínica pela via subcutânea em condições de dor pós-cirúrgica e dor relacionada ao câncer (BENÍTEZ-ROSÁRIO et al., 2011; KHAJAVI et al., 2016).

Além da possível participação de receptores TRPV1, TRPA1, PKC, canais HCN e receptores NMDA, uma outra alternativa a ser considerada como sendo responsável por mediar a hiperalgesia e edema induzidos pela aplicação subcutânea de IFN- β seria o papel de mastócitos e os efeitos desencadeados por seu processo de degranulação. Mastócitos são células imunes produzidas pela medula óssea e têm a capacidade de atravessar a parede vascular e rapidamente infiltrar tecidos, como a pele, em resposta a processos inflamatórios locais causados por lesão ou administração de agentes alérgicos (p.ex. administração subcutânea de citocinas ou prostaglandinas). Após ativação, mastócitos passam pelo processo de degranulação, no qual promovem a liberação de importantes mediadores pró-inflamatórios e pró-nociceptivos como aminas biogênicas (histamina e serotonina), citocinas (IL-1, IL-6, IFNs, TNF), metabólitos lipídicos

(leucotrienos, prostaglandinas), assim como ATP, neuropeptídeos e óxido nítrico (CHATTERJEA E MARTINOV, 2015; GALLI et al., 2005; GURISH E BOYCE 2002; McNEIL et al., 2015; NORMAN et al., 2008; REN E DUBNER, 2010; VERRI et al., 2006; WOOLF, 2010).

A importante participação de mastócitos na regulação do processamento de informações nociceptivas em quadros fisiológicos (dor nociceptiva) e patológicos (dor crônica) está bem documentada na literatura. Mastócitos são encontrados em diversos tecidos, como na pele onde estão dispostos próximo às fibras sensoriais nociceptivas que são sensibilizadas, promovendo hiperalgesia, pelos produtos de degranulação mastocitária, que também promovem vasodilatação, facilitam infiltração celular e extravasamento plasmático, importantes processos da resposta edematogênica. As fibras nociceptivas quando ativadas e sensibilizadas liberam substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, CGRP), que intensificam a ativação e degranulação mastocitária, contribuindo para o quadro de inflamação neurogênica e instalação de hiperalgesia e edema (BARBARA et al., 2004; BIRÓ et al., 1998; BISCHOFF, 2007; FERJAN E LIPNIK-ŠTANGELJ, 2013; KODA E MIZUMURA, 2002; REN E DUBNER, 2010; ROOSTERMAN et al., 2006; SANDKÜHLER, 2009; WOOLF, 2010; ZUO et al., 2003).

Moléculas estabilizadoras de mastócitos, como o cromoglicato, já foram descritas como sendo capazes de prevenir o desenvolvimento ou reduzir a intensidade da hiperalgesia e edema em diferentes modelos animais de dor. Le Filliatre et al. e Parada et al (2001) mostraram que a estabilização de mastócitos com cromoglicato prevenia as respostas hiperalgênicas e edematogênica produzidas pela estimulação elétrica do nervo safeno de ratos e pela administração subcutânea de formalina na pata de ratos, respectivamente. O cromoglicato também foi eficaz em reduzir hiperalgesia e edema em um modelo animal de dor pós-cirúrgica (OLIVEIRA et al., 2011, 2013). Esse perfil de resposta protetora contra hiperalgesia e edema também foi observado por Vicent et al. (2013) em um modelo animal de dor induzida por anemia falciforme.

Até hoje não se conhecem os mecanismos envolvidos na mediação dos efeitos adversos locais, dor e edema, após a administração subcutânea do IFN- β . Além disso, esses efeitos adversos causam redução na qualidade de vida dos pacientes com esclerose múltipla, além de redução na adesão desses pacientes ao tratamento, que por vezes leva à substituição ou até mesmo descontinuação da terapia. Adicionalmente, não existe descrito na literatura um modelo animal no qual se possa investigar os possíveis mecanismos

responsáveis pela mediação de dor e edema em pacientes que fazem uso de IFN- β para o tratamento de esclerose múltipla. Portanto, fica estabelecida a importância do presente estudo que se propôs a caracterizar um modelo animal no qual se possa investigar os prováveis mecanismos envolvidos na promoção dos efeitos pró-nociceptivos e edematogênico da administração subcutânea do IFN- β , e assim identificar alvos farmacológicos para a proposição de alternativas terapêuticas de controle e minimização de tais efeitos adversos, e consequente promoção de melhoria na qualidade de vida, assim como adesão à terapia, dos pacientes que fazem uso de IFN- β para o tratamento da esclerose múltipla.

2. HIPÓTESE

A dor e edema induzidos pela aplicação subcutânea de interferon-beta (IFN- β) são mediados pela ativação dos receptores TRPV1 e TRPA1 em neurônios sensoriais periféricos TRPV1⁺/TRPA1⁺.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar farmacologicamente um modelo animal de nocicepção e edema induzidos pela aplicação subcutânea de interferon-beta (IFN- β) em camundongos, e investigar os mecanismos envolvidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a.** Determinar o potencial de diferentes doses do IFN- β em promover dor e edema após injeção subcutânea em camundongos;
- b.** Verificar se o IFN- α também é capaz de desencadear dor e edema após sua administração por via subcutânea em camundongos;
- c.** Investigar se o receptor para interferons do tipo I (IFN- $\alpha\beta$ R1/2) e a proteína janus quinase 1 (JAK1) participam da resposta dolorosa e edematogênica induzidas por IFN- β ;
- d.** Avaliar a possível participação de receptores TRPV1 e TRPA1 na dor e edema induzidos por IFN- β ;
- e.** Determinar se a dor e edema produzidos pela aplicação subcutânea do IFN- β é dependente de fibras nociceptivas periféricas TRPV1⁺/TRPA1⁺;
- f.** Verificar se a dor e edema induzidos por IFN- β podem ser mediados por outras vias (PKC, canais HCN, receptores NMDA) e/ou tipos celulares (mastócitos) envolvidos no processo de nocicepção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6-UFSC (20-30 g) com idade entre 8 a 12 semanas, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Também foram utilizados camundongos da linhagem A129S2/SvPas (selvagem e IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-}; 20-30 g, com idade entre 8 a 12 semanas) oriundos do Biotério setorial do Laboratório de Imunobiologia das Doenças Infecciosas (LIDI) da UFSC. Todos os animais foram mantidos no Biotério Setorial do LAFEX e acondicionados em caixas acrílicas (3 a 6 animais/caixa) com forração de serragem e com sistema de circulação de ar sob pressão positiva (micro-isoladores), sob condições de temperatura controlada (20 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 07:00h) e acesso à ração e água *ad libitum*. Todos os animais foram aclimatizados à sala de experimentação por pelo menos uma hora antes do início de cada experimento. Animais provenientes do Biotério Setorial do LIDI foram aclimatizados às condições locais do LAFEX por pelo menos uma semana antes que pudessem ser utilizados em experimentos.

Com o intuito de reduzir o número total de animais utilizados ao final do presente estudo, o *N* amostral foi calculado com base em um experimento piloto considerando os limiares obtidos no teste de von Frey (página 42) como desfecho primário para os testes comportamentais. No cálculo da amostragem foram utilizados os seguintes parâmetros: desvio padrão (0,3248), diferença a ser detectada (0,6), nível de significância (5%), poder do teste (90%) e teste de hipótese (bicaudal). O tamanho da amostra foi calculado através do teste *t* de Student, e revelou um *N* de 6 animais por grupo experimental (ARMITAGE E BERRY, 1987). Após a devida numeração dos animais a composição dos grupos experimentais foi feita através de alocação randomizada com auxílio do *website* random.org.

Os experimentos realizados neste estudo foram conduzidos de acordo com as diretrizes *Animal Research and Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) (KILKENNY et al., 2010), e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob o protocolo nº PP00872.

4.2 FÁRMACOS E REAGENTES

IFN- β recombinante de camundongo foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Para mimetizar a formulação que é utilizada na prática clínica, IFN- β foi diluído em uma solução contendo 0,8 mg de albumina bovina sérica (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 10,9 mg de manitol (Synth, Diadema, SP, BR) e 0,16 mg de acetato de sódio preparada com solução salina isotônica estéril (NaCl 0,9%). A partir da solução estoque de IFN- β (1×10^5 UI) foram preparadas 10 alíquotas de 100 μ l na concentração de 1×10^4 UI e as mesmas foram acondicionadas no freezer a -80°C até o momento de uso. IFN- α recombinante de camundongo foi adquirido da PBL Assay Science (Piscataway, NJ, USA), e uma alíquota (1×10^3 UI) foi gentilmente cedida pelo Prof. André Báfica (LIDI).

Os compostos SB-366791 (antagonista do receptor TRPV1) e GF-109203X (inibidor da PKC) foram obtidos da Tocris Bioscience (Baldwin, USA), e o HC-030031 (antagonista do receptor TRPA1) foi obtido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). As soluções estoques dessas drogas foram preparadas em solução de DMSO 5% e acondicionadas a 5-8°C, -20°C e temperatura ambiente, respectivamente, até o momento de nova diluição (em NaCl 0,9%) para uso. PF-04965842 (inibidor de JAK 1), ivabradina (inibidor de canais HCN), capsaicina e resiniferatoxina (agonistas TRPV1) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A solução estoque de PF-04965842 foi preparada em DMSO 10% e acondicionada em temperatura ambiente. As soluções estoque de ivabradina, capsaicina e resiniferatoxina foram preparadas em solução salina e mantidas à temperatura de 5-8°C (ivabradina) e -20°C (capsaicina e resiniferatoxina, RTX). Cloridrato de cetamina 10% foi obtido da Syntec (Santana de Parnaíba, SP, BR) e foi diluído para uso em solução salina. Terbutalina, atropina e aminofilina, utilizadas no preparo do coquetel de proteção contra falência respiratória, foram obtidas da Hipolabor Farmacêutica (Belo Horizonte, MG, BR), Hypofarma (Ribeirão das Neves, MG, BR) e Teuto (Anápolis, GO, BR), respectivamente. O anestésico local EMLA® foi obtido da AztraZeneca (Cambridge, Inglaterra, UK).

Os iniciadores (do inglês, *primers*) utilizados para genotipagem dos animais da linhagem A129S2/SvPas foram obtidos da Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). As seqüências dos iniciadores ((Sentido

– 9850) 5' CGAGGCGAAGTGGTTAAAAG 3'; antisentido para o tipo selvagem (9851) 5' AGCGATCAACCTCATTCCAC 3'; e antisentido para o tipo mutante (olmR8963) 5'AATTCGCCACTGACAAGACG 3') foram obtidas a partir do *website* do The Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/>). Os deoxionucleotídeos trifosfatados (dNTPs) utilizados na reação de PCR foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), e a *Taq* DNA polimerase da Promega (Madison, WI, USA).

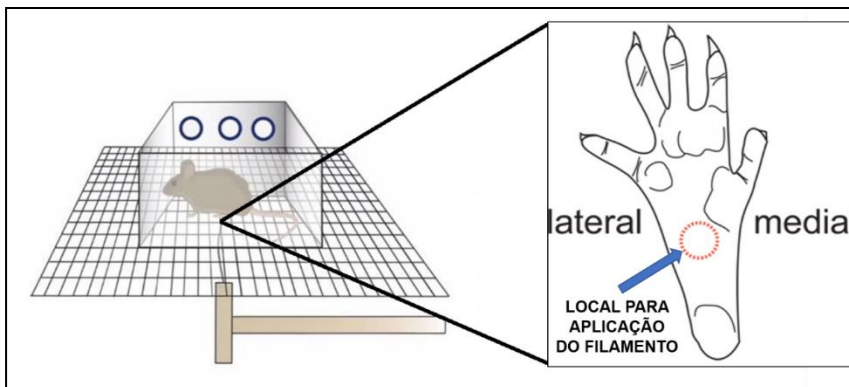
4.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL NOCICEPTIVA E DE EDEMA

4.3.1 TESTE DE VON FREY – HIPERALGESIA MECÂNICA

O teste de von Frey (método *up-down*) para avaliação do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica foi utilizado, com algumas modificações, conforme metodologia previamente descrita (CHAPLAN et al., 1994).

Brevemente, os animais foram condicionados em uma plataforma elevada com assoalho em grade para permitir acesso às suas patas e foram individualmente alocados em divisórias de acrílico. Foi permitido aos animais um período de ambientação ao aparato de pelo menos 30 minutos (ou até que o comportamento exploratório natural tivesse cessado) antes do início da avaliação. As medidas foram realizadas com a utilização de filamentos de von Frey calibrados com diferentes forças (0,008/ 0,02/ 0,07/ 0,16/ 0,4/ 1,0/ 2,0/ 4,0 g). Os filamentos foram individualmente aplicados (inicialmente filamento 0,4 g) na superfície plantar da pata traseira direita (ipsilateral) dos animais conforme ilustrado na Figura 3. Os comportamentos de levantar, chacoalhar ou lamber da pata foram consideradas repostas positivas frente à estimulação mecânica com o filamento aplicado, e após pelo menos 60 segundos um novo filamento de menor força (ex. 0,16 g) foi aplicado. Quando da ausência de resposta positiva, seguiu-se a utilização de um filamento de maior força (ex. 1,0 g). Esse protocolo prosseguiu até o final de seis aplicações ou até que fossem observadas quatro consecutivas respostas positivas ou negativas. Os resultados do teste de von Frey foram expressos como limiar de retirada da pata 50% (g), calculados conforme previamente descrito (DIXON, 1980).

Figura 3 – Diagrama do procedimento para aplicação de filamentos no teste de von Frey.



Fonte: O autor.

4.3.1.2 TESTE DE VON FREY – COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO EVOCADO: ESCORE DE GUARDA DA PATA PÓS-VON FREY

O comportamento nociceptivo evocado de guarda da pata foi avaliado conforme protocolo previamente descrito (XU E BRENNAN, 2010), levando em consideração algumas modificações. Sucintamente, animais foram observados cinco vezes durante um minuto logo após a aplicação de um dos filamentos de von Frey. Ao final de cada observação os animais receberam um escore (0-3) de acordo com o posicionamento da pata ipsilateral (local da injeção – pata direita) mais predominante em relação ao assoalho da plataforma. Escore 0 – animais permaneceram com a região plantar da pata ipsilateral totalmente pressionada contra o assoalho de grade; escore 1 – animais permaneceram com a pata ipsilateral parcialmente pressionada contra o assoalho de grade, em posição lateral ou em forma de concha; escore 2 – animais permaneceram com a pata ipsilateral totalmente recolhida do assoalho de grade, geralmente junto à lateral do corpo; escore 3 – animais permaneceram com a pata totalmente recolhida do assoalho e apresentaram comportamento de lambida da pata. Os dados decorrentes dessas cinco observações foram expressos como somatório do Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ).

4.3.2 MENSURAÇÃO DA ESPESSURA DA PATA – DESENVOLVIMENTO DE EDEMA

A mensuração da espessura da pata ipsilateral dos animais foi utilizada como indicativo do desenvolvimento de edema local após a administração dos tratamentos (NAIDU et al., 2010). As mensurações foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (Western Pro®, resolução: 0.1mm/0.01; exatidão: 0.3mm/0.01) em diferentes tempos pós-tratamento (0.5, 1, 2, 4, 8, 24 e 48h). Os valores das mensurações obtidos em diferentes tempos foram subtraídos dos valores basais, obtidos 24h antes, e foram expressos como Δ da espessura da pata (mm).

4.4 ABLAÇÃO DE NERVOS SENSORIAIS POR RESINIFERATOXINA (RTX)

A utilização de RTX (agonista TRPV1), para promover a ablação de nervos sensoriais que expressam receptores TRPV1 e TRPA1 (TRPV1⁺/TRPA1⁺), foi conduzida com base no protocolo previamente descrito na literatura (HELYES et al., 2004; RIOL-BLANCO et al., 2014), considerando-se algumas adaptações feitas com o intuito de minimizar a mortalidade entre os animais. Brevemente, os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos (RTX⁺ e RTX⁻) e submetidos a três dias consecutivos de tratamento com RTX ou veículo (solução salina) (Figura 9) conforme o seguinte esquema: dia 1 – RTX (15 μ g/kg; s.c.; 2x/dia); dia 2 – RTX (35 μ g/kg; s.c.; 2x/dia); dia 3 – RTX (50 μ g/kg; s.c.; 2x/dia). Para minimizar a ocorrência de mortalidade, foi realizada a administração de um coquetel de proteção (terbutalina – 0.5 mg/ml; atropina – 1 mg/ml; aminofilina – 240 mg/5ml; 0,1 ml/10 g de peso do animal – i.p.) contra falência respiratória, imediatamente e somente, após o primeiro tratamento com RTX no dia 1. Para confirmação da ablação dos neurônios TRPV1⁺/TRPA1⁺, foram realizados o teste de limpeza do olho, teste da acetona e teste de Hargreaves.

4.4.1 TESTE DE LIMPEZA DO OLHO – PERDA DE SENSIBILIDADE À CAPSAICINA

Para confirmação da ablação dos neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺, uma semana após o primeiro tratamento com RTX ou solução salina, os animais foram submetidos ao teste de limpeza do olho frente à estimulação

com solução salina ou capsaicina (50 μ l – 100 μ M), conforme descrito previamente (BRITTAIN et al., 2011; FARIZAFARD et al., 2005), levando em consideração algumas adaptações. Após aplicação das soluções, os animais foram alocados embaixo de um funil de vidro transparente, observados durante um minuto e o número de comportamentos de limpeza do olho (do inglês, *eye-wiping*) foi registrado. Todos os animais inicialmente receberam aplicação corneal de solução salina, e depois de cinco minutos receberam a aplicação de capsaicina. Os resultados foram expressos como N° de comportamentos de limpeza do olho.

4.4.2 TESTE DA ACETONA – PERDA DE SENSIBILIDADE NOCICEPTIVA A ESTIMULO TÉRMICO FRIO

Para verificação da perda de sensibilidade nociceptiva à estimulo térmico frio e confirmação da ablação dos neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ pelo tratamento com resiniferatoxina (RTX), os animais foram submetidos ao teste da acetona que foi realizado com base em metodologia anteriormente descrita (MINETT et al., 2011), e implementação de algumas modificações. Brevemente, os animais foram trazidos para sala de experimentos pelo menos uma hora antes do início da avaliação comportamental para devida aclimatização. Posteriormente, os animais foram individualmente alocados em divisórias de acrílico dispostas uma plataforma elevada (a mesma utilizada para o teste de von Frey) e lhes foi permitido 30 minutos de ambientação antes do início do teste. O teste consistiu na aplicação, com o auxílio de uma micropipeta, de 50 μ l de acetona (PA) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) dos animais. Após a aplicação da acetona, animais foram observados durante um minuto e o tempo que dispensaram exibindo comportamentos nociceptivos (elevação constante, chacoalhar e lamber da pata) foi registrado com o auxílio de um cronômetro, e os dados foram expressos com Comportamento nociceptivo em segundos (s). Os animais foram submetidos ao teste da acetona 24 horas antes (Basal I – BI) e 21 dias após (Basal II – BII) o primeiro tratamento com RTX.

4.4.3 TESTE DE HARGREAVES – PERDA DE SENSIBILIDADE NOCICEPTIVA A ESTIMULO TÉRMICO QUENTE

A avaliação da perda de sensibilidade nociceptiva à estímulo térmico quente em animais submetidos ao protocolo de ablação sensorial (neurônios TRPV1⁺/TRPA1⁺) foi realizada através do teste de Hargreaves, conforme

previamente descrito na literatura (HARGREAVES et al., 1988; AUSTIN et al., 2012), considerando algumas modificações. Sucintamente, o teste de Hargreaves consistiu na estimulação da região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) dos animais com uma fonte radiante de luz infravermelha (calor) através de uma plataforma com cobertura de vidro acrílico. Os animais foram contidos pela mão do experimentador e a fonte radiante (Ugo Basile®) posicionada logo abaixo da pata ipsilateral e, quando o animal estava imóvel, a fonte foi ligada e a latência em segundos (s) para que o animal elevasse, chacoalhasse ou retirasse a pata da direção da fonte de calor foi automaticamente registrada pelo aparelho. Um limite de 20 segundos de estimulação foi estabelecido para evitar danos teciduais nas patas dos animais. Os animais passaram por pelo menos duas sessões de aclimatização, com uma hora de duração, às condições experimentais para minimizar os níveis de estresse no momento do teste. Os dados foram expressos como Latência (s). Os animais foram submetidos ao teste de Hargreaves 24 horas antes (Basal I – BI) e 21 dias após (Basal II – BII) o primeiro tratamento com RTX.

4.5 GENOTIPAGEM DE CAMUNDONGOS 129S2/SvPas (selvagem e IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-})

4.5.1 ISOLAMENTO DO DNA TOTAL DA CAUDA DE CAMUNDONGOS

A cauda dos camundongos foi coletada ao final da realização dos experimentos logo após ortoeutanásia, e foi armazenada em tubos de 1,5 ml à -80°C até o momento da extração. Fragmentos de aproximadamente 2 mm foram digeridos por lise alcalina, pela adição de 75 μ l da solução de digestão (25 mM NaOH e 0,2 mM de EDTA, pH 12), e incubados por 1 h a 98°C em banho seco. Posteriormente, os tubos foram incubados em gelo por 2 minutos, e então foi adicionado 75 μ l da solução de neutralização (40 mM Tris-HCl, pH 5). Os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante coletado (TRUETT et al., 2000). A concentração e pureza do produto da extração foram avaliadas através de espectrofotometria a 260 e 280 nm em equipamento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). O DNA extraído foi estocado a -20°C até o uso.

4.5.2 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS GÊNICOS VIA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os ácidos nucleicos extraídos conforme protocolo descrito acima foram utilizados como molde para amplificar, via reação em cadeia da polimerase (do inglês, PCR), os fragmentos característicos para genotipagem dos camundongos 129S2/SvPas (selvagem e IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-}). Para tal, foram utilizados os seguintes iniciadores: Comum (Sentido – 9850) 5' CGAGGCGAAGTGGTTAAAAG 3', antisentido para o tipo selvagem (9851) 5' AGCGATCAACCTCATTCCAC 3' e antisentido para o tipo mutante (olmR8963) 5' AATTCGCCACTGACAAGACG 3'.

Os três iniciadores para PCR foram combinados em reações contendo: 30 ng do DNA total, 0,5 pmol de cada um dos três iniciadores, 200 μ M de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase em tampão apropriado. As reações foram compostas de uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C durante 2 minutos. Subsequentemente, foram realizados 10 ciclos com as etapas de desnaturação (94°C/20 segundos), ligação dos iniciadores a sequência alvo (65°C/15 segundos, com decréscimo de 0,5°C/ciclo) e elongação da cadeia de DNA pela polimerase (68°C/10 s). Posteriormente, foram realizados mais 28 ciclos com os seguintes passos: 94°C/15 segundos, 60°C/15 segundos e 72°C/10 segundos. Ao término destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final da cadeia de DNA a 72 °C/2 minutos. Estes passos foram realizados em um termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos da amplificação obtidos foram revelados em géis de agarose (2%), corados por brometo de etídio (1 μ g/ml) e registrados digitalmente.

4.6 DESENHOS EXPERIMENTAIS

Todos os experimentos foram realizados entre uma hora após o início do ciclo claro e uma hora antes do início do ciclo escuro aos quais os animais estavam submetidos (08:00-18:00h; 09:00-19:00 – horário de verão). Animais foram aclimatizados às condições experimentais pelo menos 24 horas antes do início dos experimentos, marcado pela determinação das medidas basais dos animais com relação aos parâmetros avaliados. Para garantir a reprodutibilidade dos dados, todos os experimentos foram realizados em 2-3 blocos até que o *N* experimental de cada grupo estivesse completo. Os animais foram sempre aleatoriamente distribuídos entre os grupos experimentais, e o experimentador foi sempre mantido “cego” com relação aos tratamentos administrados e/ou genótipos dos animais até o fim

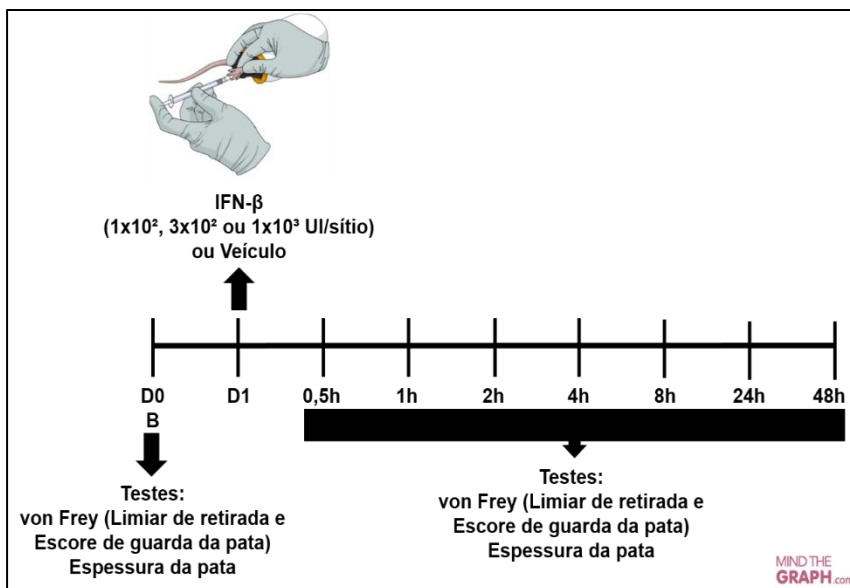
de cada experimento, quando o cegamento foi quebrado para a realização das análises estatísticas.

4.6.1 EXPERIMENTO I – INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PRÓ-NOCEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO INTERFERON-BETA (IFN- β)

Neste primeiro bloco experimental foram realizados experimentos para a determinação da curva dose-resposta e do decurso temporal dos potenciais efeitos pró-nociceptivos e edematogênico do interferon-beta (IFN- β). Animais foram submetidos ao teste de von Frey, teste de guarda da pata e aferição de espessura da pata direita traseira (ipsilateral) para estabelecimento de suas medidas basais, 24 h (D0) horas antes da administração do IFN- β . Após determinação das medidas basais, os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais (veículo, IFN- β 1×10^2 , IFN- β 3×10^2 , IFN- β 1×10^3 ; $10 \mu\text{l}$ – s.c.). Após a administração dos tratamentos (D1), na região plantar da pata ipsilateral pela via subcutânea (s.c.), animais foram submetidos aos testes de von Frey, guarda da pata e aferição da espessura da pata ipsilateral nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 8, 24 e 48 horas (Figura 4). A dose de IFN- β , assim como os tempos de avaliação e intervenção para os próximos experimentos foram escolhidos com base neste primeiro bloco experimental.

As doses (1×10^2 , 3×10^2 , 1×10^3 UI/sítio; s.c.) testadas neste primeiro bloco experimental foram determinadas com base no estudo de Tuohy et al. (2000), no qual o potencial efeito benéfico do IFN- β em retardar a progressão da encefalomielite autoimune em um modelo animal (camundongo) de esclerose múltipla. Como uma forma de mimetizar as condições de uso do IFN- β no ambiente clínico de tratamento da esclerose múltipla, a via subcutânea (s.c.), na região plantar da pata ipsilateral dos animais, foi utilizada para as administrações nos animais no presente estudo. Além disso, o veículo utilizado para diluição do IFN- β e administração no grupo veículo foi o mesmo utilizado na formulação comercial do IFN- β (Rebif®). Não obstante, cálculos alométricos para ajuste de dose foram conduzidos para que os animais recebessem doses proporcionalmente compatíveis com àquelas utilizadas por pacientes no tratamento da esclerose múltipla (JANKOVIC, 2010; KAGAN et al., 2010; PACHALY, 2006; SHARMA E McNEILL, 2009; TORKILDSEN et al., 2016; TUOHY et al., 2000).

Figura 4 – Desenho experimental I: investigação dos efeitos pró-nociceptivos e edematogênico do interferon-beta (IFN- β).

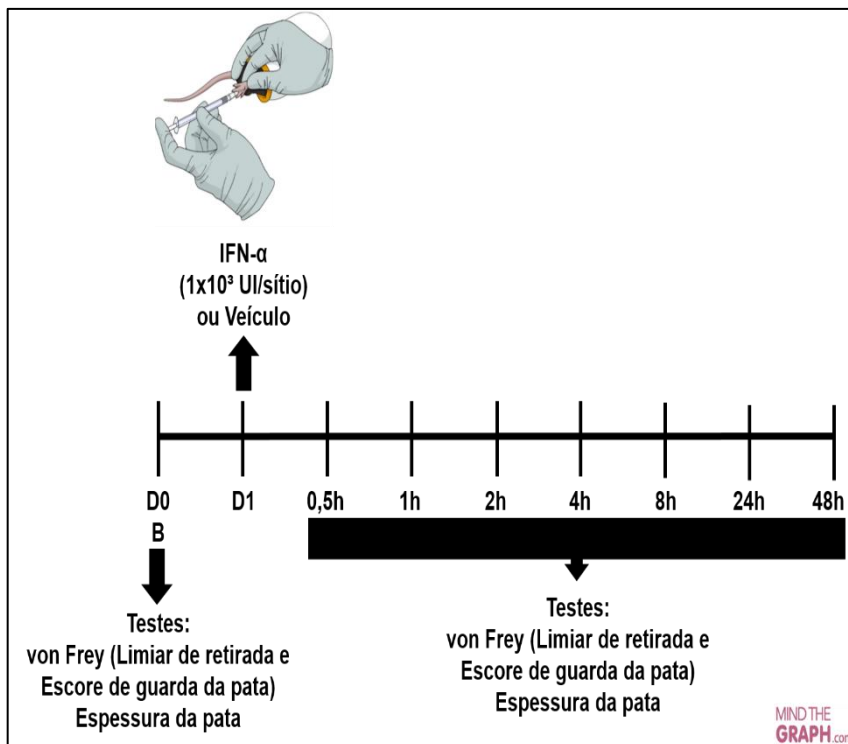


Legenda – B (Basal); D (Dia); H (horas); UI (Unidades Internacionais).
Fonte: O autor.

4.6.2 EXPERIMENTO II – INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS PRÓ-NOCEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO INTERFERON-ALFA (IFN- α)

Os experimentos neste segundo bloco experimental foram conduzidos para investigar se um segundo IFN do tipo I, IFN- α (PLATANIAS, 2005), poderia apresentar potenciais efeitos pró-nociceptivos e edematogênico. Os animais foram novamente submetidos ao teste de von Frey, teste de guarda da pata e aferição de espessura da pata direita traseira (ipsilateral) para estabelecimento de suas medidas basais no D0, e foram distribuídos em dois grupos experimentais (veículo e IFN- α – 1×10^3 UI/sítio). No D1, animais receberam administração de IFN- α ($10 \mu\text{l}$ – 1×10^3 UI/sítio; s.c.) e se seguiu a realização da avaliação pelos testes de von Frey, guarda da pata e aferição da espessura da pata ipsilateral nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 8, 24 e 48 horas pós-administração de IFN- α (Figura 5).

Figura 5 – Desenho experimental II: investigação dos efeitos pró-nociceptivos e edematogênico do interferon-alfa (IFN- α).



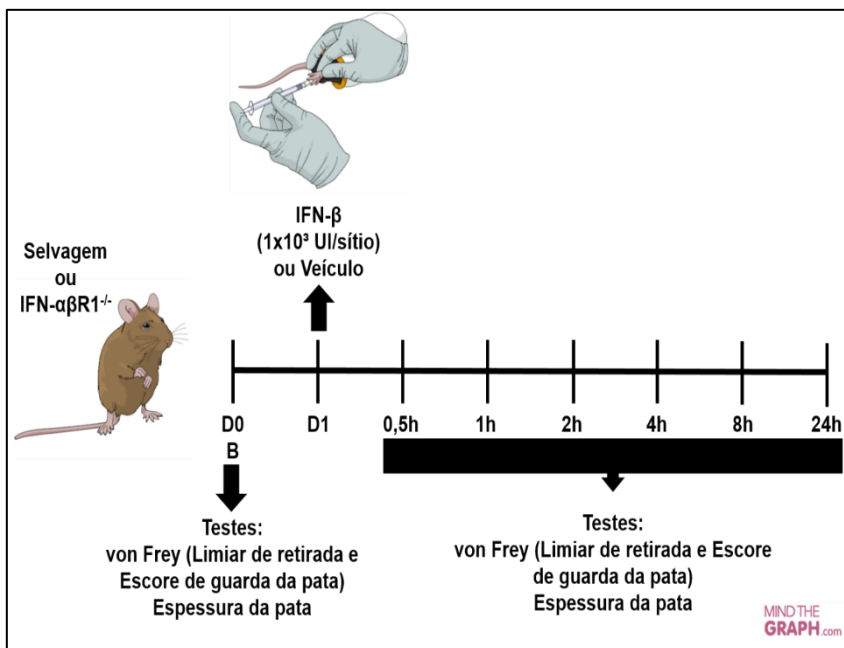
Legenda – B (Basal); D (Dia); H (horas); UI (Unidades Internacionais).
Fonte: O autor.

4.6.3 EXPERIMENTO III – INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE INTERFERONS DO TIPO I, IFN- $\alpha\beta$ R1, NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β

Este terceiro bloco de experimentos buscou avaliar se os efeitos hiperalgésicos e edematogênico pela administração subcutânea de IFN- β poderiam estar sendo mediados pela ligação do IFN- β ao seu receptor, IFN- $\alpha\beta$ R1, e decorrente ativação de sua cascata de sinalização (PLATANIAS, 2005). Para isso, foram utilizados animais da linhagem A129S2/SvPas dos tipos selvagem (IFN- $\alpha\beta$ R1^{+/+}) e *knockout* (IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-}). As medidas basais

foram aferidas no D0 e os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (selvagem e $\text{IFN-}\alpha\beta\text{R1}^{-/-}$); e no D1 os animais receberam a administração de $\text{IFN-}\beta$ ($10\ \mu\text{l} - 1 \times 10^3\ \text{UI/sítio}$; s.c.). Nos experimentos realizados anteriormente, os animais apresentaram os efeitos hiperalgésicos e edematogênico até 24 horas após administração de $\text{IFN-}\beta$, neste bloco experimental os animais foram avaliados apenas até o tempo de 24 horas (Figura 6).

Figura 6 – Desenho experimental III: investigação do envolvimento do receptor de interferons do tipo I, $\text{IFN-}\alpha\beta\text{R1}$, nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico do $\text{IFN-}\beta$.

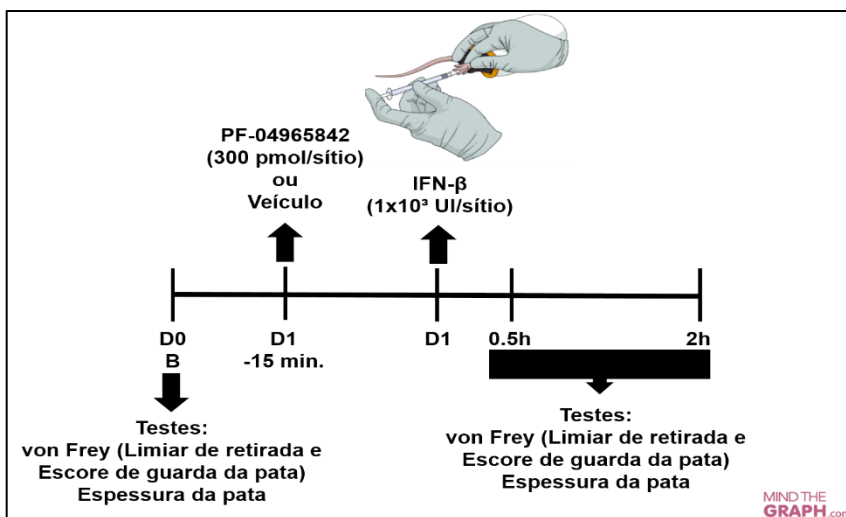


Legenda – B (Basal); D (Dia); H (horas); UI (Unidades Internacionais).
Fonte: O autor.

4.6.4 EXPERIMENTO IV – INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA SINALIZAÇÃO VIA JAK1 NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO $\text{IFN-}\beta$

Com o intuito de investigar se a sinalização intracelular clássica desencadeada pelo IFN- β (PLATANIAS, 2005) poderia estar mediando seus efeitos hiperalgésicos e edematogênico, o inibidor de JAK1, PF-04965842, foi utilizado como pré-tratamento. A aferição das medidas basais foi realizada em D0 e os animais foram então distribuídos em dois grupos experimentais, grupo veículo (DMSO 0,1% – 10 μ l/sítio; s.c.) e grupo PF-04965842 (10 μ l – 300 pmol/sítio; s.c.). No D1, o tratamento com PF-04965842 foi realizado 15 minutos antes da administração de IFN- β (1×10^3 UI/sítio; s.c.). Com base nos decursos temporais observados nos experimentos anteriores, os tempos de meia e 2 horas após a administração de IFN- β foram escolhidos como pontos de checagem onde os animais foram submetidos aos testes de von Frey, guarda da pata e aferição da espessura da pata ipsilateral (Figura 7). A dose de PF-04965842 utilizada nestes experimentos foi calculada com base em estudos realizados em modelos animais (camundongos) de doença do enxerto contra o hospedeiro (CHOI et al., 2014), no qual o inibidor de JAK1 ruxolitinibe foi testado, e com base na IC₅₀ do PF-04965842 (29 nM) e do ruxolitinibe (2.8 nM).

Figura 7 – Desenho experimental IV: investigação do papel da sinalização via JAK1 nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico do IFN- β .

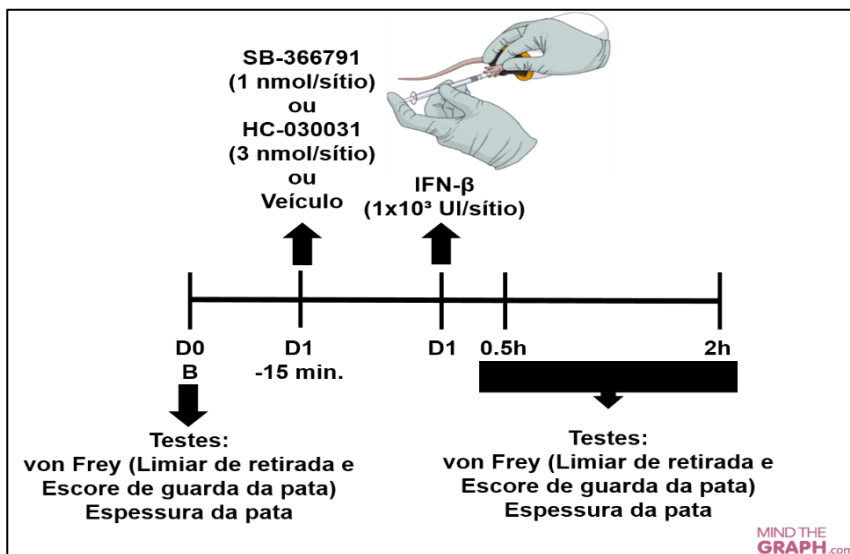


Legenda – B (Basal); D (Dia); H (horas); UI (Unidades Internacionais); Min. (minutos). Fonte: O autor.

4.6.5 EXPERIMENTO V – INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β

Como forma de avaliar a possível participação dos receptores TRPV1 e TRPA1 nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico do IFN- β , os fármacos SB-366791 e HC-030031, antagonistas TRPV1 e TRPA1 respectivamente, foram utilizados como pré-tratamento. Após a realização das medidas basais no D0, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais: grupo veículo (DMSO 0,1% – 10 μ l/sítio; s.c.), grupo SB-366791 (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.) e grupo HC-030031 (10 μ l – 3 nmol/sítio; s.c.). Os pré-tratamentos foram realizados no D1 15 minutos antes da administração do IFN- β (1x10³ UI/sítio; s.c.). Novamente, os animais foram submetidos à avaliação nos testes de von Frey, guarda da pata e aferição da espessura da pata ipsilateral nos tempos de 30 minutos e 2 horas após a administração do IFN- β (Figura 8). As doses de SB-366791 e HC-030031 utilizadas neste bloco experimental foram escolhidas com base em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa (FERREIRA et al., 2005; HOFFMEISTER et al., 2011; TONELLO et al., 2017; TREVISAN et al., 2016).

Figura 8 – Desenho experimental V: investigação da participação dos receptores TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia e edema causados pelo IFN- β .



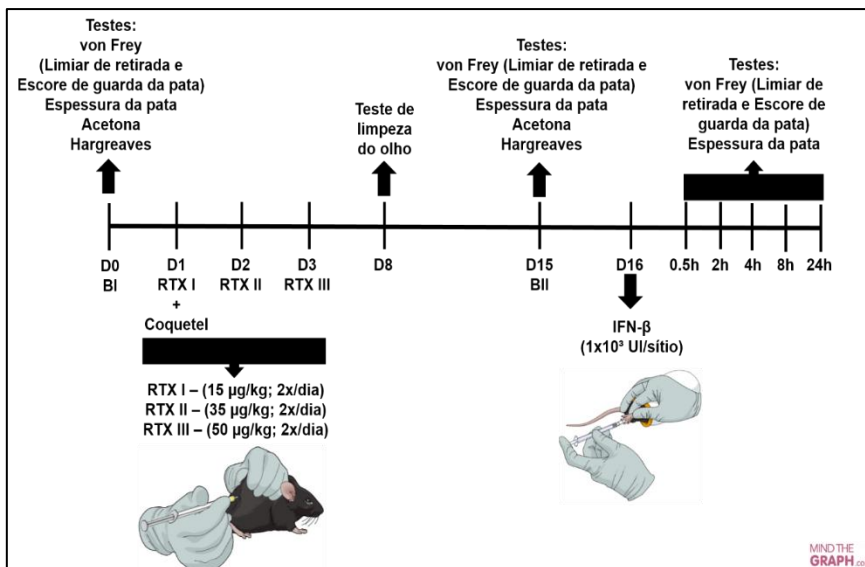
Legenda – B (Basal); D (Dia); H (horas); UI (Unidades Internacionais); Min. (minutos). Fonte: O autor.

4.6.6 EXPERIMENTO VI – INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NEURÔNIOS SENSORIAIS TRPV1⁺/TRPA1⁺ NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β

Para investigar a participação de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ na hiperalgesia e edema causados pelo IFN- β , e para tal, os animais utilizados foram previamente submetidos ao protocolo de ablação de neurônios sensoriais pelo tratamento sistêmico com resiniferatoxina (RTX), conforme previamente descrito no item 4.4 do presente documento. As medidas basais dos animais utilizados nestes experimentos foram tomadas 24 horas antes do primeiro tratamento com RTX ou veículo (solução salina 0,9%) (Basal I – BI) e 24 horas antes da aplicação do IFN- β (Basal II – BII), para fins de comparação. As medidas de BII foram realizadas no D15 e os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos RTX⁺ (sofreu ablação) e RTX⁻ (sem ablação) condições para as quais o experimentador foi posteriormente “cegado”. No D16, animais receberam a administração de IFN- β (1×10^3

UI/sítio; s.c.), e as avaliações pelos testes de von Frey, guarda da pata e aferição da espessura da pata ipsilateral foram realizadas nos tempos de 30 minutos, 2, 4, 8 e 24 horas após a administração de IFN- β (Figura 9).

Figura 9 – Desenho experimental VI: investigação do envolvimento de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ na hiperalgesia e edema causados pelo IFN- β .



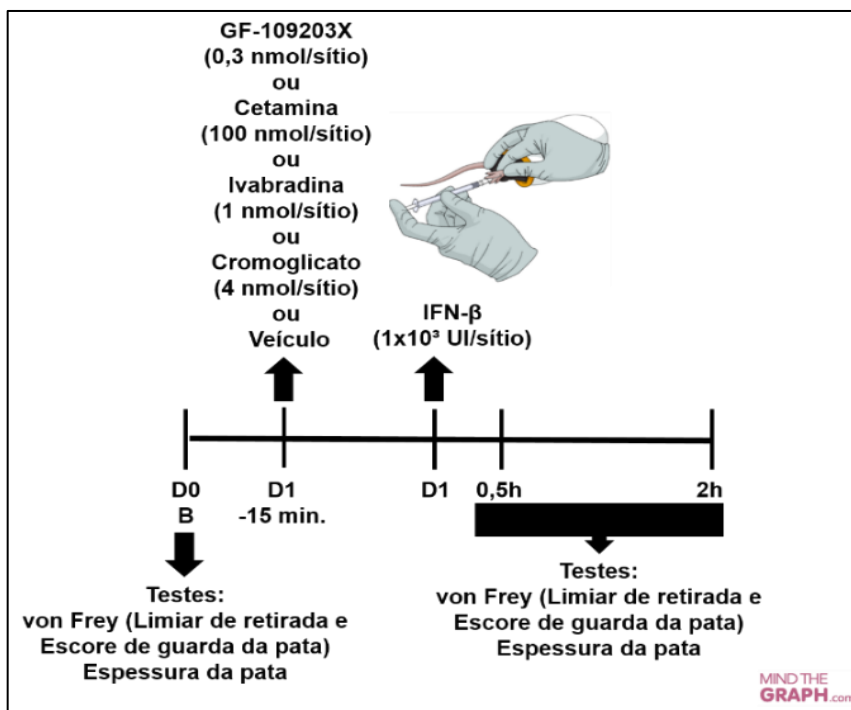
Legenda – B (Basal); D (Dia); H (horas); UI (Unidades Internacionais).
Fonte: O autor.

4.6.7 EXPERIMENTO VII – INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS MECANISMOS ALTERNATIVOS ENVOLVIDOS NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β

Com o objetivo de tentar identificar mecanismos alternativos que possam estar envolvidos nos efeitos hiperalgésicos os seguintes fármacos foram utilizados como pré-tratamento: GF-109203X (inibidor de PKC), cetamina (antagonista NMDA), ivabradina (inibidor de canais HCN) e cromoglicato (estabilizador de mastócitos). Após a realização das medidas basais no D0, os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais:

veículo (DMSO 0,1% – 10 µl/sítio; s.c.), GF-109203X (10 µl – 0,3 nmol/sítio; s.c.), cetamina (10 µl – 100 nmol/sítio; s.c.), ivabradina (10 µl – 1 nmol/sítio; s.c.) e cromoglicato (10 µl – 4 nmol/sítio; s.c.). Os animais receberam os tratamentos no D1 15 minutos antes da administração do IFN-β (1x10³ UI/sítio; s.c.), e as medidas para os parâmetros avaliados foram realizadas meia e 2 horas após a injeção de IFN-β. As doses utilizadas dos fármacos foram escolhidas com base em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa e/ou disponíveis na literatura (DAVIDSON E CARLTON, 1998; FERREIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

Figura 10 – Desenho experimental VII: investigação de possíveis mecanismos alternativos envolvidos na hiperalgesia e edema causados pelo IFN-β.



Legenda – B (Basal); D (Dia); H (horas); UI (Unidades Internacionais); Min. (minutos). Fonte: O autor.

4.7 DESTINO DOS ANIMAIS

Ao final dos experimentos, os animais foram encaminhados para o biotério setorial do Departamento de Farmacologia onde foram submetidos à ortoeutanásia em câmara de CO₂. Quando esta alternativa não foi possível, os animais foram submetidos à ortoeutanásia pelo método de deslocamento cervical. A confirmação da morte dos animais foi realizada pela verificação da ausência de movimentos torácicos e sinais de respiração, ausência de batimentos cardíacos e pulso, e perda do reflexo corneal (CONCEA, 2013).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no presente estudo estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 5-6 animais por grupo experimental, conforme indicado na legenda das figuras. O teste de Grubbs foi utilizado para a verificação da existência de valores *outliers* entre os dados, e os valores identificados como tal foram excluídos das análises estatísticas. O teste de Grubbs foi realizado em uma plataforma virtual disponível *online* (<https://graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>). As análises estatísticas foram realizadas por meio das análises de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com ou sem medidas repetidas, seguidas pelos testes *post-hoc* de Dunnett e/ou Sidak conforme necessário. O nível de diferença estatística foi considerado significativo quando os valores de *P* encontrados foram menores que 0.05 ($P < 0.05$). Todas as análises dos dados, assim como a confecção dos gráficos, foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 7® (La Jolla, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1 EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO INTERFERON-BETA (IFN- β)

A injeção subcutânea (s.c.), na região plantar da pata ipsilateral dos animais, do IFN- β (3×10^2 e 1×10^3 UI/sítio) promoveu, de forma significativa, uma rápida e duradoura redução no limiar de retirada da pata 50% (g) dos animais (hiperalgesia mecânica) quando comparados ao grupo veículo e valores basais (Figura 11, painéis A e B). A resposta hiperalgésica inicial foi observada meia hora após a administração de IFN- β , com efeito máximo entre 1 e 4 horas. A hiperalgesia mecânica perdurou por 24 horas, quando comparado ao grupo veículo (Figura 11, painel A).

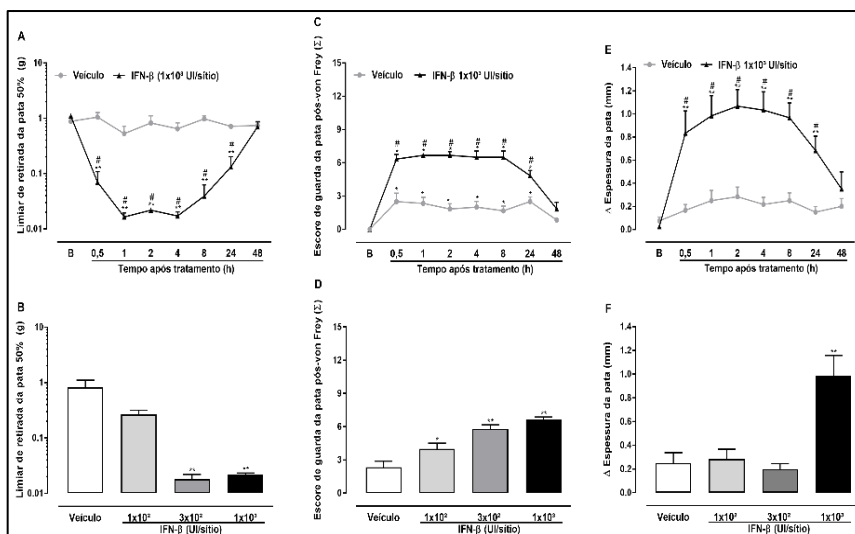
Também foi possível observar um significativo aumento no comportamento nociceptivo evocado, pela aplicação dos filamentos de von Frey, dos animais que receberam diferentes doses de IFN- β (1×10^2 , 3×10^2 , 1×10^3 UI/sítio; s.c.), quando estes foram avaliados no teste de guarda da pata, e em comparação ao grupo veículo, assim como quanto aos valores basais (Figura 11, painéis C e D). Novamente, observou-se o início do efeito hiperalgésico do IFN- β 30 minutos após sua administração, permanecendo constante por até oito horas e perdurando por até 24 horas (Figura 11, painel C). Além disso, a administração do veículo, por si só, também promoveu uma elevação no escore de nocicepção evocada em relação aos valores basais; porém, com menor intensidade quando comparada ao IFN- β .

Um significativo potencial edematogênico do IFN- β apenas foi observado em animais que receberam a dose de 1×10^3 UI/sítio, quando estes foram comparados aos animais que receberam veículo (Figura 11, painéis E e F). O desenvolvimento de edema nos animais tratados com IFN- β (1×10^3 UI/sítio) seguiu o mesmo decurso temporal observado nos demais parâmetros avaliados, com resposta edematogênica inicial aos 30 minutos, e edema máximo duas horas após a injeção do IFN- β . No entanto, o edema perdurou por até 48 horas quando comparado aos valores basais. Ainda assim, diferença significativa em comparação ao grupo veículo apenas foi verificada até 24 horas após a administração do IFN- β (Figura 11, painel E).

Neste primeiro bloco de experimentos, o IFN- β induziu hiperalgesia mecânica, aumento do comportamento nociceptivo e edema 1×10^3 UI/sítio.

Adicionalmente, o efeito inicial do IFN- β foi observado 30 minutos após sua administração, com picos de resposta após duas horas. Com base nisso, os próximos experimentos foram realizados utilizando a dose de 1×10^3 UI/sítio e as medidas dos parâmetros avaliados foram efetuadas nos tempos de 30 minutos e duas horas após a administração do IFN- β .

Figura 11 – Efeito pró-nociceptivo e edematogênico da administração subcutânea (s.c.) do interferon-beta (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^2 , 3×10^2 e 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Decurso temporal do efeito do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**C** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**E** – Δ Espessura da pata (mm)). Curva dose-resposta do efeito do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.), duas horas após sua administração, sobre os parâmetros de nocicepção mecânica (**B**), comportamento nociceptivo evocado (**D**) e indução de edema de pata (**F**). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N = 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas (**A**, **C**, **E**) ou ANOVA de uma via (**B**, **D**, **F**), seguidas pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P < 0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (**) – Representa $P < 0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($P < 0.05$) quando comparado ao grupo veículo. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers* e um animal do grupo IFN- β (3×10^2 UI/sítio) (**B**, **D**, **F**) foi excluído das análises estatísticas realizadas por ter sido identificado como um *outlier*.



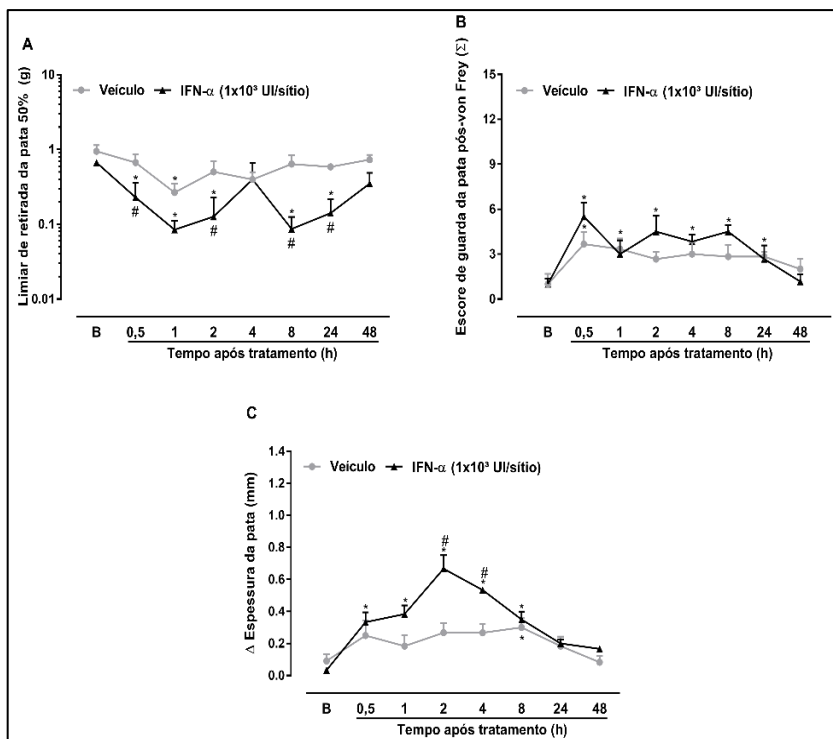
5.2 INTERFERON-ALFA (IFN- α) TAMBÉM APRESENTA EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO

Conforme pode ser verificado na Figura 12 (painel A), a administração do IFN- α (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.), assim como o IFN- β (Figura 11), também foi capaz de causar uma significativa hiperalgesia mecânica quando comparado ao grupo veículo. O efeito hiperalgésico inicial também foi observado nos primeiros 30 minutos após a administração do IFN- α , com resposta máxima entre 1 e 8 horas, perdurando de forma intermitente por até 24 horas.

Com relação ao comportamento nociceptivo evocado (Figura 12, painel B), não foi possível verificar uma diferença significativa entre os grupos IFN- α e veículo. Contudo, é possível observar que a administração de IFN- α , ou veículo, elevou significativamente o escore de guarda da pata pós-von Frey 30 minutos após suas administrações, quando comparada aos seus próprios valores basais (Figura 12, painel B). Diferentemente do observado nos blocos de experimentos com IFN- β , o grupo veículo dos experimentos com IFN- α apenas apresentou diferença significativa em relação aos seus valores basais nos tempos de 30 minutos e uma hora após sua administração, enquanto o escore dos animais do grupo IFN- α permaneceu significativamente elevado por até 24 horas.

De forma semelhante ao IFN- β , o IFN- α apresentou potencial edematogênico, com resposta inicial observada meia hora após sua administração e com pico máximo de resposta edematogênica no tempo de duas horas. Contudo, uma diferença significativa em comparação com o grupo veículo apenas foi verificada nos tempos de duas e quatro horas após a administração do IFN- α (Figura 12, painel C).

Figura 12 – Efeito da administração subcutânea (s.c.) do interferon-alfa (IFN- α ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Decurso temporal do efeito do IFN- α (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado ao grupo veículo. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.



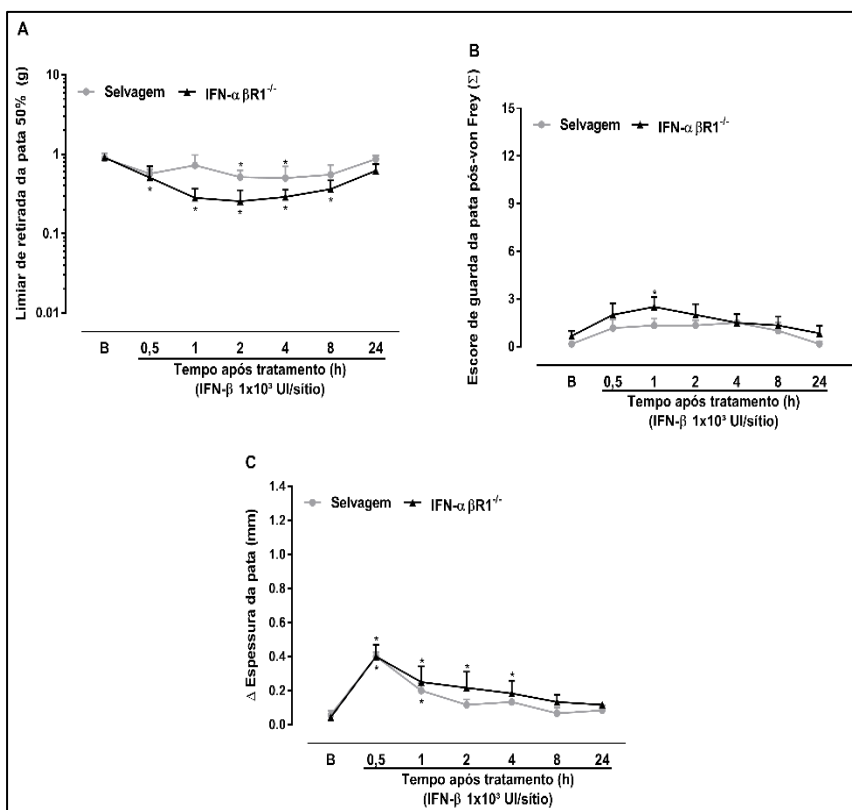
5.3 O RECEPTOR DE IFN- β (IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$) NÃO ESTÁ ENVOLVIDO NOS EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β

Experimentos de genotipagem foram realizados com o intuito de garantir que os animais da linhagem A129S2/SvPas utilizados nos experimentos de nocicepção realmente apresentavam genótipo do tipo selvagem (IFN- $\alpha\beta R1^{+/+}$) ou deleção (do inglês, *knockout*) para a subunidade um do receptor de IFN- β (IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$). Conforme ilustrado na Figura (13), foi verificado que dos 8 animais de cada genótipo (selvagem e IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$) apenas um animal do tipo selvagem (8) foi identificado com um genótipo diferente do esperado, uma vez que apresentava heterozigose (IFN- $\alpha\beta R1^{+/-}$) com relação à subunidade um do receptor de IFN- β . Esse animal em heterozigose foi excluído do grupo selvagem, e os demais animais tanto do grupo selvagem quanto do grupo IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$ foram aleatoriamente distribuídos em seus respectivos grupos até que ambos tivessem seis animais, e os dados obtidos para esses animais foram os considerados nas análises estatísticas.

Na Figura 14 (painel A) é possível observar que animais da linhagem A129S2/SvPas *knockout* para o gene que codifica a subunidade um do receptor do IFN- β (IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$) desenvolvem uma significativa hiperalgesia mecânica quando comparados aos valores de medidas basais. Esse efeito hiperalgésico inicial foi observado 30 minutos após a injeção de IFN- β , com pico de resposta no tempo de duas horas, e perdurou por até oito horas. Contudo, não foi encontrada uma diferença significativa entre eles e os animais selvagens dessa mesma linhagem. Além disso, estes animais da linhagem A129S2/SvPas (Selvagem e IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$) pareceram ainda apresentar uma menor sensibilidade contra o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica após a administração de IFN- β .

Tanto animais selvagens quanto animais IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$ não apresentaram um significativo aumento de comportamento nociceptivo evocado (Figura 14, painel B) após a administração de IFN- β , quando foram feitas comparações com relação às medidas basais, exceto por animais IFN- $\alpha\beta R1^{-/-}$ no tempo de uma hora.

Figura 14 – Efeito da administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem A129S2/SvPas (selvagem e *knockout* – IFN- $\alpha\beta$ R1 $^{-/-}$). Decurso temporal do efeito do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.

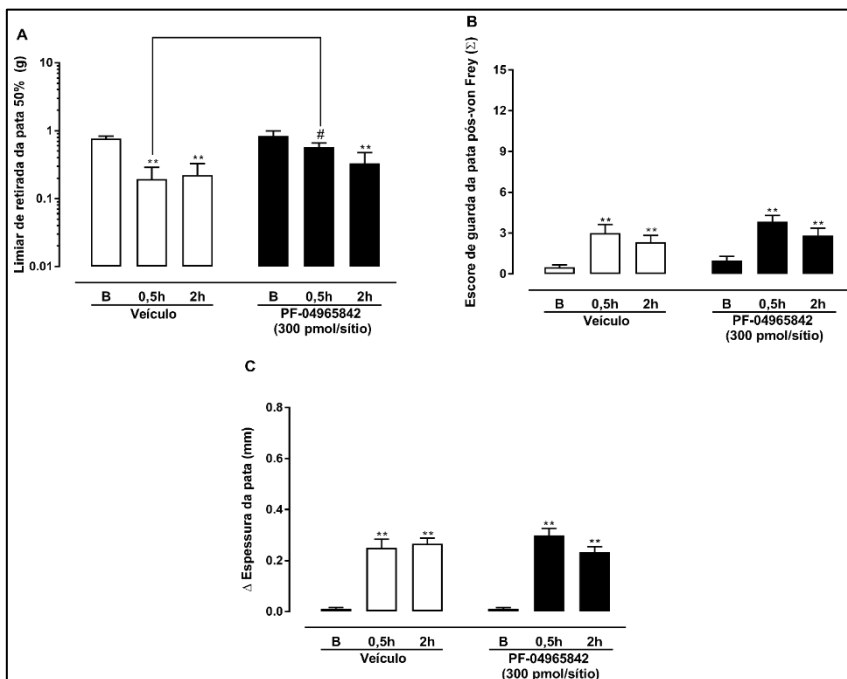


5.4 O EFEITO PRÓ-NOCICEPTIVO DO IFN- β É PARCIALMENTE PREVENIDO COM A INIBIÇÃO DA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR MEDIADA VIA JAK1

O pré-tratamento com PF-04965842 (10 μ l – 300 pmol/sítio; s.c.), um inibidor de JAK1, preveniu parcialmente a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de IFN- β (1×10^3 UI/sítio; s.c.). O efeito anti-hiperalgésico do PF-04965842 não foi duradouro, uma vez que foi observado apenas nos primeiros 30 minutos após a administração de IFN- β (Figura 15, painel A).

Apesar de ter parcialmente prevenido o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, o pré-tratamento com o PF-04965842 não foi capaz de prevenir o aumento do comportamento nociceptivo evocado (Figura 15, painel B) e nem a produção de edema (Figura 15, painel C), quando comparado ao grupo veículo.

Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com inibidor de JAK1, PF-04965842 (10 μ l – 300 pmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênicas induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Efeito do PF-04965842 (10 μ l – 300 pmol/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), 30 minutos e 2 duas horas após a administração do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (***) – Representa $P < 0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($P < 0.05$) quando comparado ao grupo veículo. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.



5.5 O PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTA TRPV1 E TRPA1 NÃO PREVINE A HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS POR IFN- β

Com o intuito de investigar a participação de receptores TRPV1 e TRPA1 no efeito pró-nociceptivo e edematogênico promovido pelo IFN- β , animais foram tratados com antagonista TRPV1 (SB-366791; 10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.) e antagonista TRPA1 (HC-030031; 10 μ l – 3 nmol/sítio; s.c.) antes da administração de IFN- β (Figuras 16 e 17, respectivamente).

Conforme ilustrado nas Figura 16 e 17 (painéis A), o pré-tratamento com SB-366791 (1 nmol/sítio) ou HC-030031 (3 nmol/sítio) não foi capaz de prevenir a hiperalgesia mecânica causada pelo IFN- β , em comparação ao veículo. Contudo, é possível observar que os animais do grupo previamente tratado com HC-030031 (Figura 17, painel A), não apresentaram hiperalgesia mecânica 30 minutos após a administração do IFN- β , considerando comparação com os valores de medidas basais. Curiosamente, não foi verificada diferença significativa entre os grupos veículo e HC nesse tempo de 30 minutos ($P=0.21$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Sidak).

O pré-tratamento com os antagonistas TRPV1 e TRPA1 também foram ineficazes em prevenir uma elevação do comportamento nociceptivo evocado nos animais (Figuras 16 e 17, painéis B). Animais pré-tratados com SB-366791 apresentaram um perfil de resposta semelhante aos animais do grupo veículo (Figura 16, painel B). No entanto, os animais que receberam tratamento prévio com HC-030031 demonstraram um menor escore de guarda da pata pós-von Frey em comparação com os animais do grupo veículo (Figura 17, painel A). Apesar disso, essa diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa (0.5h – $P=0.49$; 2h – $P=0.36$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Sidak).

O efeito edematogênico do IFN- β também não foi prevenido pelo SB-366791 (Figura 16, painel C) e nem pelo HC-030031 (Figura 17, painel C). Foi possível observar que o edema verificado nos animais do grupo SB-366791 e HC-030031 foram ligeiramente menores quando comparados ao grupo veículo, ainda assim, nenhuma diferença significativa foi detectada nas análises realizadas (SB-0.5h – $P=0.29$, SB-2h – $P=0.44$; HC-0.5 – $P=0.25$, HC-2H – $P=0.25$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Sidak).

Figura 16 – Efeito do pré-tratamento com antagonista TRPV1, SB-366791 (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênicas induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Efeito do SB-366791 IFN- β (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), 30 minutos e 2 duas horas após a administração do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (**) – Representa $P < 0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.

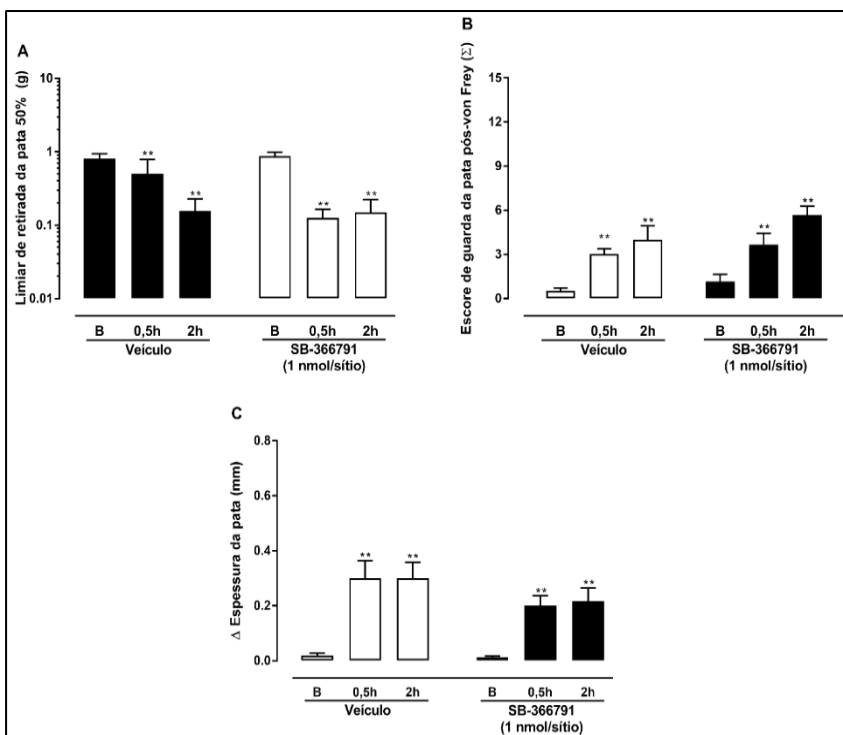
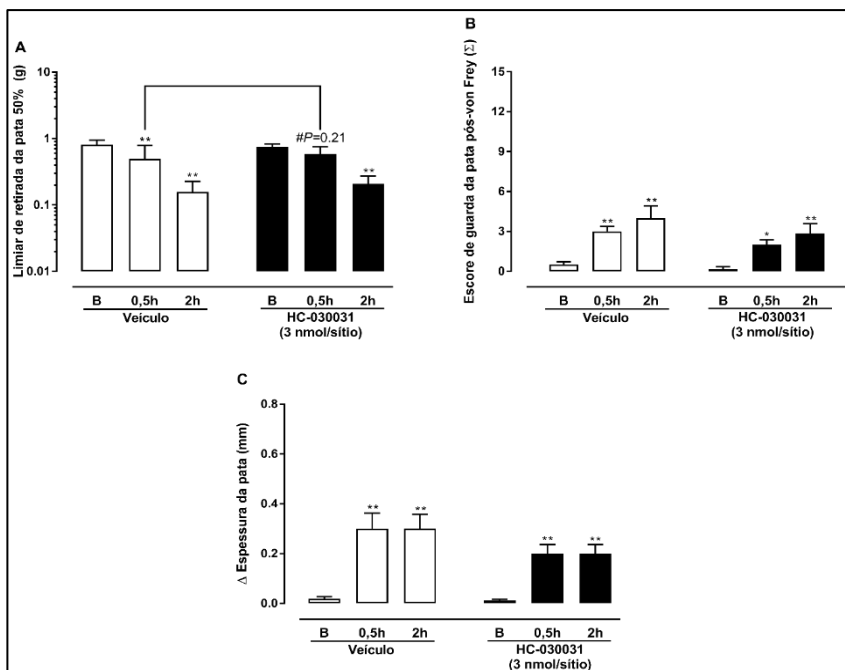


Figura 17 – Efeito do pré-tratamento com antagonista TRPA1, HC-030031 (10 μ l – 3 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênicas induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Efeito do HC-030031 (10 μ l – 3 nmol/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), 30 minutos e 2 duas horas após a administração do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (**) – Representa $P<0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa o valor de P encontrado para comparação com o grupo veículo no tempo de 30 minutos pós-administração de IFN- β . O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.



5.6 A ABLAÇÃO DE NEURÔNIOS SENSORIAIS TRPV1⁺/TRPA1⁺ PREVINHA PARCIALMENTE OS EFEITOS HIPERALGÉSICOS DO IFN- β

A confirmação da ablação dos neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ foi realizada pela avaliação nociceptiva comportamental no teste de limpeza do olho (Figura 18, painel D), teste da acetona (Figura 18, painel E) e teste de Hargreaves (Figura 18, painel F). No teste de limpeza do olho, os animais do grupo RTX⁺ apresentaram uma resposta significativamente reduzida à aplicação corneal do agonista TRPV1 capsaicina (50 μ l – 100 μ M), representada pelo menor número de comportamentos de limpeza do olho em comparação com o grupo RTX⁻ (Figura 18, painel D).

No teste da acetona, os animais que sofreram ablação dos neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ apresentaram uma resposta basal significativamente menor, (BII – 21 dias após a primeira administração de RTX), ao rápido resfriamento (ativador TRPA1) plantar (pata ipsilateral) induzido pela aplicação de acetona em comparação com a medida basal BI (24 horas antes da primeira administração de RTX) (Figura 18, painel E). Já no teste de Hargreaves, a latência para resposta nociceptiva (elevação/chacoalhar da pata) frente ao estímulo plantar (pata ipsilateral) com calor radiante (ativador TRPV1) nos animais RTX⁺ foi significativamente maior em BII quando comparado à BI (Figura 18, painel F). A combinação destes dados fornece parâmetros nociceptivo-comportamentais para a confirmação de que o protocolo utilizado para indução da ablação dos neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ foi efetivo.

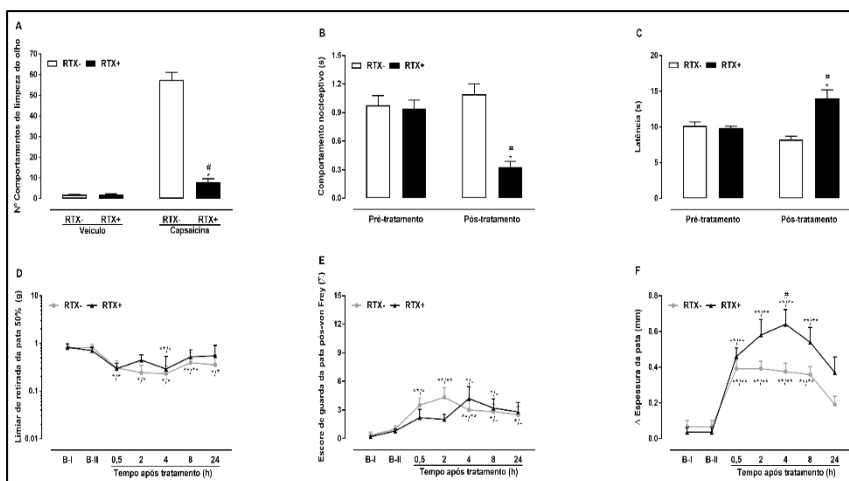
De acordo com o ilustrado na Figura 18 (painel A), animais que foram submetidos à ablação de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺, pelo tratamento com resiniferatoxina (RTX – 30, 70 e 100 μ g/kg; s.c.), apenas apresentaram uma hiperalgesia mecânica pontual quatro horas após a administração do IFN- β , isso quando comparados aos seus valores de medidas basais (BI e BII). Contudo, não foi possível verificar diferença significativa entre os grupos RTX⁺ (com ablação) e RTX⁻ (sem ablação) em nenhum dos pontos avaliados do decurso temporal.

O aumento no comportamento nociceptivo evocado nos animais com ablação dos neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ também aconteceu de forma pontual, sendo observado nos tempos de quatro e oito horas após a administração de IFN- β , e apenas com relação às comparações feitas com os valores de medidas basais BI (Figura 18, painel B).

Apesar do efeito anti-hiperalgésico parcial sobre os parâmetros nociceptivos avaliados, a estratégia de ablação prévia dos neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ não foi eficaz em prevenir o efeito edematogênico do IFN- β (Figura 18, painel C). Além disso, o edema observado nos animais do grupo RTX⁺ foi numericamente maior quando comparado ao edema observado nos animais do grupo RTX⁻. De fato, foi possível identificar uma diferença significativa entre os grupos no tempo de quatro horas após a administração do IFN- β , onde os animais do grupo RTX⁺ apresentaram o maior nível de edema comparado ao grupo RTX⁻.

Figura 18 – Efeito da ablação prévia de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ com resiniferatoxina (RTX – 30, 70 e 100 μ g/kg; s.c.) sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1x10³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Decurso temporal do efeito da ablação prévia de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ com resiniferatoxina (RTX – 30, 70 e 100 μ g/kg; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B**– Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), induzidas pela administração do IFN- β (10 μ l – 1x10³ UI/sítio; s.c.). **D** – Confirmação da ablação de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ pelo teste de limpeza do olho (expresso como N° de comportamentos de limpeza do olho), frente à estimulação corneal com capsaicina (50 μ l – 100 μ M) ou veículo (solução salina 0.9%). **E** – Confirmação da ablação de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ pelo teste da acetona (expresso como Comportamento nociceptivo em segundos (s)), frente à estimulação plantar (pata ipsilateral) com acetona, resfriamento rápido, (50 μ l – PA). **F** – Confirmação da ablação de neurônios sensoriais TRPV1⁺/TRPA1⁺ pelo teste de Hargreaves (expresso como Latência em segundos (s)), frente à estimulação plantar (pata ipsilateral) com calor radiante. Dados estão representados como média \pm E.P.M. (N= 6/grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos

testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (**) – Representa $P<0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado ao grupo veículo. (BI) – Basal I. (BII) – Basal II. (/) – Símbolos dispostos ao lado esquerdo representam comparação com BI e ao direito com BII. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.



5.7 A SINALIZAÇÃO VIA PKC NÃO ESTÁ ENVOLVIDA NOS EFEITOS PRÓ-NOCEPTIVOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β .

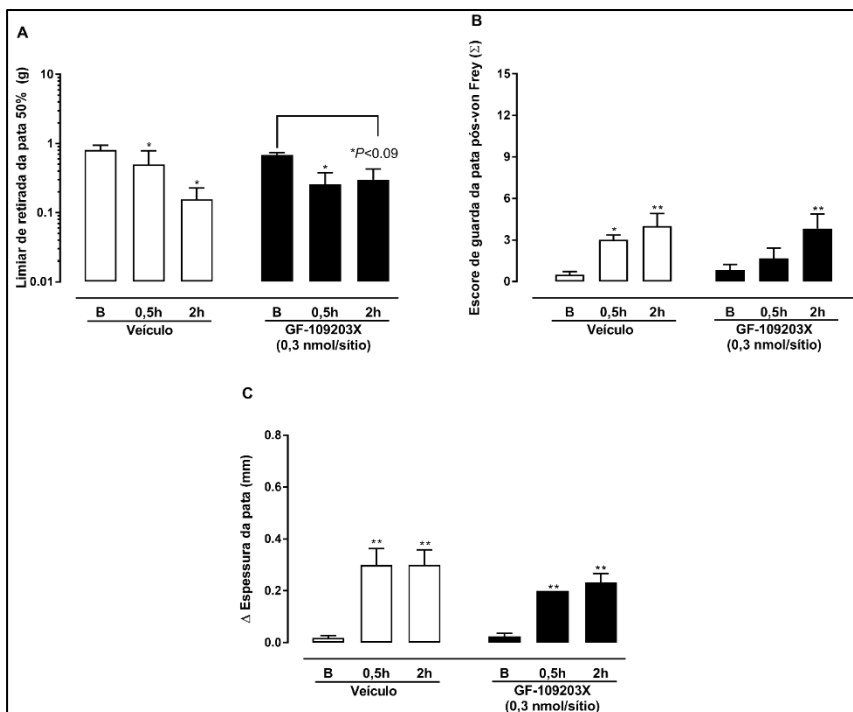
Conforme pode ser observado na Figura 19 (painel A), a estratégia de pré-tratamento com um inibidor de PKC, GF-109203X (10 μ l – 0,3 nmol/sítio; s.c.), também foi ineficaz na prevenção do desenvolvimento de hiperalgesia mecânica induzida por IFN- β . Ainda, foi possível observar que no tempo de duas horas após a administração de IFN- β , os animais pré-tratados com GF-109203X não apresentaram hiperalgesia mecânica quando comparados aos seus próprios valores de medidas basais. Contudo, o valor

de $P=0,09$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Dunnett), permite inferir que há uma tendência para a verificação de hiperalgesia no tempo de duas horas.

Não foi possível verificar um efeito positivo do pré-tratamento com GF-109203X em prevenir o aumento no comportamento nociceptivo evocado frente à administração do IFN- β quando comparado ao grupo veículo, mesmo no tempo de 30 minutos onde os animais não apresentaram diferença significativa quando as comparações foram feitas com relação aos valores de medidas basais ($P=0.57$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Dunnett), (Figura 19, painel B).

Apesar do edema verificado em animais pré-tratados com GF-109203X ter sido numericamente menor, não foi possível encontrar diferença estatística significativa quando comparado com os animais do grupo veículo (0.5h – $P=0.20$; 2h – $P=0.53$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Sidak), (Figura 19, painel C).

Figura 19 – Efeito do pré-tratamento com inibidor de PKC, GF-109203X (10 μ l – 0,3 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Efeito do GF-109203X (10 μ l – 0,3 nmol/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), 30 minutos e 2 duas horas após a administração do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (**) – Representa $P<0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.

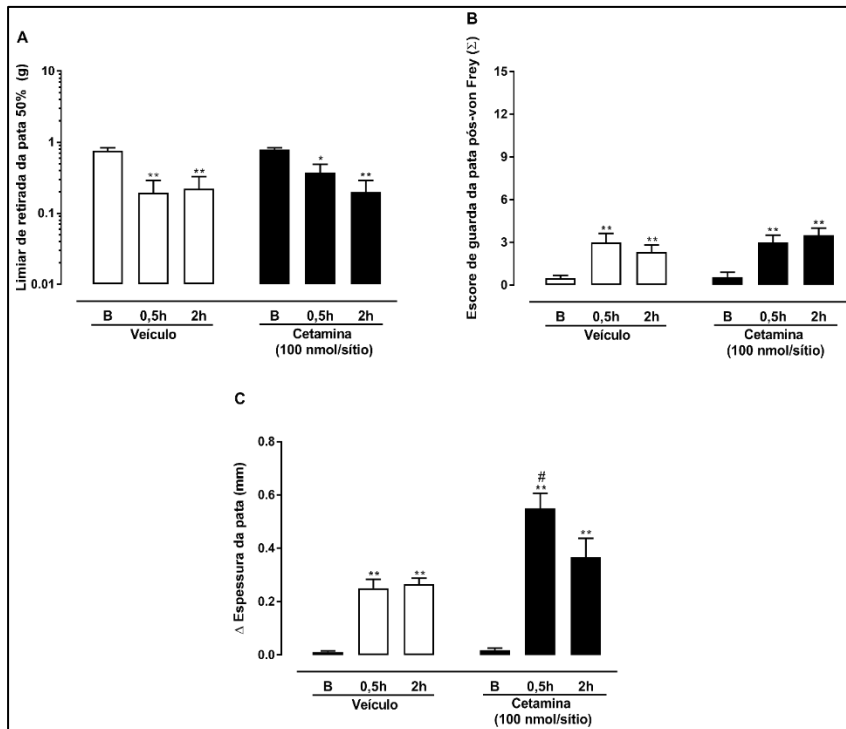


5.8 OS EFEITOS PRÓ-NOCICEPTIVOS E EDEMATOGÊNICOS DO IFN- β NÃO SÃO PREVENIDOS PELO ANTAGONISMO DE RECEPTORES NMDA

O antagonismo de receptores NMDA com cetamina (10 μ l – 100 nmol/sítio) não foi capaz de prevenir a hiperalgesia mecânica (Figura 20, painel A), nem a elevação no escore de comportamento nociceptivo evocado (Figura 20, painel B) causada pelo IFN- β , quando comparado ao grupo veículo.

Essa estratégia também não permitiu a prevenção do desenvolvimento de edema induzido por IFN- β . De fato, a cetamina ainda provocou o desenvolvimento de um edema ainda mais acentuado 30 minutos após a injeção do IFN- β , quando comparado ao edema dos animais do grupo veículo nesse mesmo tempo (Figura 20, painel C).

Figura 20 – Efeito do pré-tratamento com antagonista NMDA, cetamina (10 μ l – 100 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Efeito da cetamina (10 μ l – 100 nmol/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), 30 minutos e 2 duas horas após a administração do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (**) – Representa $P<0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado ao grupo veículo. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.



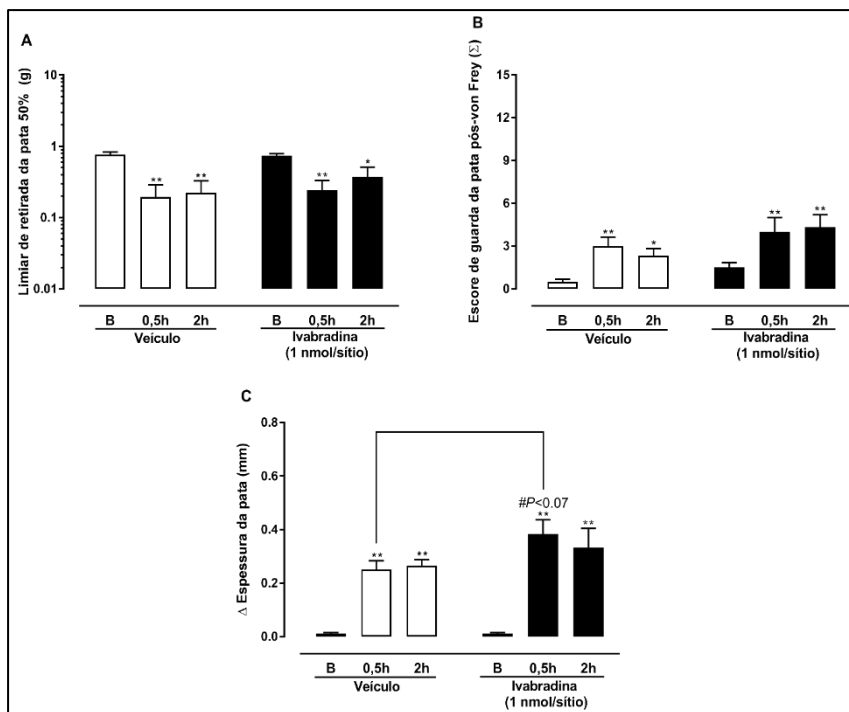
5.9 A INIBIÇÃO DE CANAIS DO TIPO HCN NÃO PREVINE A HIPERALGESIA MECÂNICA NEM O EDEMA INDUZIDOS POR IFN- β

Quando animais foram, previamente à administração do IFN- β , tratados com um inibidor de canais do tipo HCN, ivabradina (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.), ainda foi verificado o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica de forma similar aos animais do grupo veículo (Figura 21, painel A).

O tratamento prévio com ivabradina também não impediu o aumento no escore de comportamento nociceptivo evocado dos animais (Figura 21, painel B).

Além disso, o edema verificado em animais do grupo ivabradina, ainda que não significativamente diferente do grupo veículo, foi ligeiramente maior em ambos os tempos observados (Figura 21, painel C). De fato, foi possível detectar inclusive uma tendência a ser significativamente diferente no tempo de 30 minutos em comparação ao grupo veículo, ($P=0.07$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Sidak), similarmente ao observado em animais pré-tratados com cetamina.

Figura 21 – Efeito do pré-tratamento com inibidor de canais HCN, ivabradina (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1 \times 10³ UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Efeito da ivabradina (10 μ l – 1 nmol/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B** – Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), 30 minutos e 2 duas horas após a administração do IFN- β (10 μ l – 1 \times 10³ UI/sítio; s.c.). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N=$ 6/grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (**) – Representa $P<0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa o valor de P encontrado para comparação com o grupo veículo no tempo de 30 minutos pós-administração de IFN- β . O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.



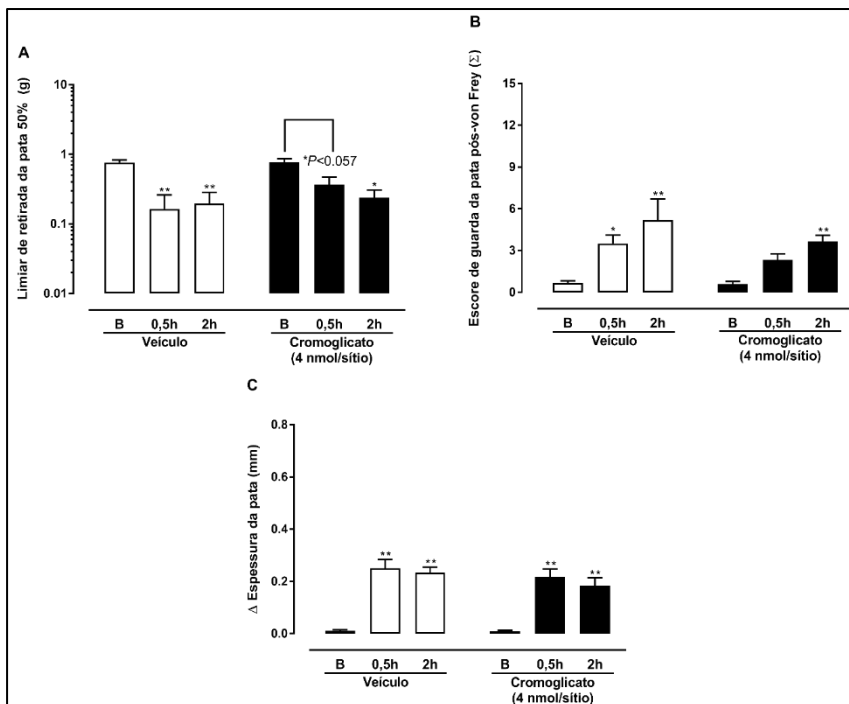
5.10 A DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS NÃO ESTA ENVOLVIDA NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β

A Figura 22 ilustra o efeito do pré-tratamento com o estabilizador de mastócitos cromoglicato (10 μ l – 4 nmol/sítio; s.c.). Como pode ser observado, animais tratados com cromoglicato previamente à administração do IFN- β continuaram a desenvolver hiperalgesia mecânica de forma semelhante aos animais do grupo veículo (Figura 22, painel A). Contudo, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa no tempo de meia hora nos animais do grupo cromoglicato em relação aos valores de medidas basais. Ainda assim, o valor de P encontrado, ($P=0,057$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Dunnett), indica uma tendência para a verificação de uma diferença significativa frente às medidas basais.

O cromoglicato também não preveniu a elevação do escore de comportamento nociceptivo evocado quando comparado ao grupo veículo. No entanto, no tempo de meia hora não foi verificada diferença com relação às medidas basais nos animais do grupo cromoglicato, ($P=0.13$; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Dunnett), conforme pode ser observado no painel B da Figura 22.

Assim como observado com os demais tratamentos testados, o cromoglicato não apresentou a capacidade de prevenir o desenvolvimento do edema induzido pelo IFN- β (Figura 22, painel C).

Figura 22 – Efeito do pré-tratamento com estabilizador de mastócitos, cromoglicato (10 μ l – 4nmol/sítio; s.c.), sobre as atividades pró-nociceptivas e edematogênica induzidas pela administração subcutânea (s.c.) do interferon- β (IFN- β ; 10 μ l – 1×10^3 UI/sítio) na região plantar da pata direita traseira (ipsilateral) de camundongos machos da linhagem C57BL/6-UFSC. Efeito do cromoglicato (10 μ l – 4 nmol/sítio; s.c.) sobre a nocicepção mecânica (**A** – Limiar de retirada da pata 50% (g)), comportamento nociceptivo evocado (**B**– Escore de guarda da pata pós-von Frey (Σ)) e a indução edema de pata (**C** – Δ Espessura da pata (mm)), 30 minutos e 2 duas horas após a administração do IFN- β (10 μ l – 1×10^3 UI/sítio; s.c.). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 6$ /grupo) de 2-3 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnett e Sidak conforme necessário. (B) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($P<0.05$) quando comparado aos valores de medidas basais. (**) – Representa $P<0.01$ quando comparado aos valores de medidas basais. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de possíveis *outliers*, e não foram encontrados *outliers*.



6. DISCUSSÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória do sistema nervoso central, que é caracterizada pela desmielinização axonal de neurônios presentes no cérebro e medula espinhal. A EM promove intensa incapacitação física em mais de 2,5 milhões de adultos jovens, principalmente mulheres, em todo o mundo. A causa da EM é desconhecida, e a doença se manifesta de forma bastante heterogênea com pacientes apresentando uma miríade de distúrbios sensoriais, prejuízos motores, fadiga, dor e déficits cognitivos. O decurso da EM se apresenta de forma bastante variada, ainda assim na maioria dos pacientes a doença inicialmente se desenvolve com episódios reversíveis de déficits neurológicos, frequentemente seguidos de deterioração progressiva (BROWNLEE et al., 2016; COMPSTON E COLES, 2008; CHARCOT, 1868; DENDROU et al., 2015; NOSEWORTHY et al., 2000; ROXBURGH et al., 2005). A EM recorrente-remitente é a principal forma dessa doença e atinge cerca de 85% dos pacientes. Dentre as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da EM uma das mais utilizadas e de destaque para o presente estudo é o IFN- β . (BROWNLEE et al., 2016; DENDROU et al., 2015; LUBLIN et al., 2014; McDONALD et al., 2001; RANSOHOFF et al., 2015; POLMAN et al., 2011).

O IFN- β , uma citocina imunomodulatória, foi a primeira opção terapêutica aprovada em 1996 para o tratamento da EM capaz de reduzir a progressão da doença. Apesar do tratamento com IFN- β ser de maneira geral bem tolerado em pacientes com esclerose múltipla, o desenvolvimento de reações no local da injeção (dor e edema) contribuem de forma significativa para a redução da qualidade de vida dos pacientes, assim como para uma menor adesão ao tratamento, principalmente entre os primeiros 3-6 meses após o início da terapia. Ainda não se sabem os mecanismos que medeiam o desenvolvimento de dor e edema em pacientes que fazem uso do IFN- β pela via subcutânea. Adicionalmente, não existe descrito na literatura um modelo animal no qual se possa investigar como o IFN- β causa tais efeitos adversos e assim seja possível propor alternativas terapêuticas que possam contribuir para a melhoria na adesão à terapia com IFN- β e na qualidade de vida de pacientes com esclerose múltipla (ARNOLDUS et al., 2000; COLES et al., 2006; COMI et al., 2016; GOTTFBERG et al., 2000; HAUSER et al., 2013; JACOBS et al., 1996; KÜMPFEL et al., 2007; MOHR et al., 1998; NEILLEY et al., 1996; PANITCH et al., 2002; TORKILDSEN et al., 2015; WINGERCHUK E WEINSHENKER, 2016).

No presente estudo, padronizamos um modelo animal de nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea (na região plantar da pata direita traseira dos animais) do IFN- β .

Na fase de caracterização do modelo, diferentes doses de IFN- β (1×10^2 , 3×10^2 , 1×10^3 UI/sítio; s.c.) foram testadas quanto ao seu potencial em produzir nocicepção e edema em animais machos da linhagem C57BL/6-UFSC. A escolha das doses testadas foi feita com base nas doses que são utilizadas para o tratamento da esclerose múltipla na prática clínica, e cálculos alométricos foram efetuados para adequação das mesmas ao modelo animal. Dentre as doses testadas, apenas a dose de 1×10^3 UI/sítio (s.c.) foi capaz de significativamente promover hiperalgesia mecânica (teste de von Frey), elevar o comportamento nociceptivo evocado (Escore de guarda da pata pós-von Frey), e induzir o desenvolvimento de edema (Espessura da pata), conforme observado em pacientes com esclerose múltipla que fazem uso do IFN- β pela via subcutânea (AGASHIVALA et al., 2013; ARNOLDUS et al., 2000; BALAK et al., 2000; BAUM et al., 2007; BEER et al., 2011; BUTTMAN et al., 2004; COMI et al., 2008; CLERICO et al., 2007; DEVONSHIRE et al., 2011; FOLEY et al., 2013; HARRIS et al., 2005; KLAUER E ZETTL, 2008; MENZIN et al., 2013; O'ROURKE E HUTCHINSON, 2005; PANITCH et al., 2002; PORTACCIO E AMATO, 2009; PRISMS, 1998; SINGER et al., 2012; TREADAWAY et al., 2009).

O decurso temporal da hiperalgesia e edema no modelo em camundongos foi compatível ao apresentado em seres humanos (HARRIS et al., 2005; SINGER et al., 2012). Finalmente, verificamos que semelhante ao observado em seres humanos (BUTTMAN et al., 2004), a nocicepção e edema induzidos pelo IFN- β não estão relacionados ao seu veículo, uma vez que este não foi capaz de causar hiperalgesia e edema quando comparado à administração de salina (dados não mostrados). Desta forma, o presente modelo possui validades de constructo (indução pela aplicação subcutânea do IFN- β e em dose similar à utilizada na prática clínica) e facial (induz nocicepção e edema nos mesmos tempos onde esses efeitos adversos são verificados em pacientes), o que faz do mesmo uma interessante ferramenta para estudar os efeitos adversos locais induzidos pelo IFN- β .

Para confirmar os achados com o IFN- β , testamos em nosso modelo um outro interferon do tipo I, o IFN- α . Além de compartilharem ligação ao mesmo receptor, IFNs do tipo compartilham também a mesma via de sinalização intracelular (JAK-STAT). Interessantemente, pacientes que fazem uso de IFN- α também apresentam dor no local da injeção e também podem desenvolver edema (CHA et al., 2014; GERLACH et al., 2009; GIBBERT et al., 2013; JAECKEL et al., 2001; LEE et al., 2008; MICROMEDEX, 2017; OWCZAREK et al., 1997; PLATANIAS, 2005; VALLÉS et al., 2009; WEERD E NGUYEN, 2012). Considerando isso, os potenciais efeitos pró-nociceptivos e pró-edematogênico do IFN- α (1×10^3 UI/sítio; s.c.) também foram investigados no presente estudo.

O que observamos foi que a administração subcutânea de IFN- α , na dose testada, foi capaz de promover significativa hiperalgesia mecânica (von Frey test) quando comparado ao grupo veículo (30 minutos, 2, 8, 24 horas após a injeção de IFN- α). Contudo, diferente do verificado após a administração do IFN- β (na mesma dose), a hiperalgesia mecânica promovida pelo IFN- α foi menos intensa e intermitente. O IFN- α não foi capaz de provocar uma significativa elevação do comportamento nociceptivo evocado quando comparado aos animais do grupo veículo, apenas em relação às suas próprias medidas basais. Assim como a hiperalgesia mecânica, o edema causado pelo IFN- α foi também intermitente (2 e 4 horas – comparado ao grupo veículo) e numericamente menor se comparado ao produzido pelo IFN- β .

Apesar de compartilharem ligação a um mesmo receptor, o IFN- β e o IFN- α o fazem de maneira diferenciada. O IFN- β apresenta uma maior afinidade pelo receptor, podendo ficar ligado ao mesmo e mediar seus efeitos de forma mais intensa e prolongada que o IFN- α . Levando isso em consideração, talvez fosse necessária uma maior dose do IFN- α para que efeitos mais similares aos produzidos pelo IFN- β fossem observados (DENDROU et al., 2015; GONZÁLES-NAVAJAS et al., 2012; IVASHKIV E DOLIN, 2014; PLATANIAS, 2005; STARK et al., 1998; WEERD et al., 2013). Adicionalmente, é possível que esse diferente perfil de resposta hiperalgésica e edematogênica seja simplesmente algo inerente ao próprio IFN- α , semelhante aos diferentes potenciais antivirais verificados entre os 13 tipos de IFN- α . Essas diferenças poderiam também ser explicadas, pelo menos em parte, por dissimilaridades entre o IFN- β e o IFN- α na ativação e fosforilação de STATs, TYKs e MAPKs, as quais também contribuem para os efeitos pleiotrópicos de IFNs do tipo I. Apesar de apresentarem perfis diferentes, ambos interferons do tipo I testados são capazes de promover hiperalgesia e

edema, o que indica uma provável participação do IFN- $\alpha\beta$ R1/2 na mediação de tais efeitos. (CHA et al., 2014; GIBBERT et al., 2013; PLATANIAS, 2005; WEERD et al., 2013).

6.1 RECEPTOR DE INTERFERONS DO TIPO I (IFN- $\alpha\beta$ R1/2) E OS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β

O IFN- β , assim como o IFN- α e outros IFNs do tipo I, exerce muitos dos seus efeitos biológicos através de interação com seu receptor específico, o receptor de IFNs do tipo I (IFN- $\alpha\beta$ R1/2), e consequente ativação de sua cascata de sinalização intracelular clássica via JAK-STAT. (CHEN et al., 2004; DARNELL et al., 1994; IHLE, 1995; PLATANIAS, 2003; 2005) (HURTADO-GUERRERO et al., 2017; JAECKEL et al., 2001; PERRILLO, 2009; PESTKA, 2007; PLATANIAS, 2003; 2005; TALPAZ et al., 2013; WEERD et al., 2013). Apesar da sinalização via IFN- $\alpha\beta$ R1/2 ser importante para os efeitos terapêuticos de IFNs do tipo I, não se sabe se os efeitos adversos agudos (logo após administração do tratamento), como reações no local da injeção (edema, eritema, dor) e sintomas tipo-gripe (dor de cabeça, febre, tontura, mialgia, fadiga), são mediados pela ativação do IFN- $\alpha\beta$ R1/2 (GEORGE et al., 2012; GOEB et al., 2006; KALINKE E PRINZ, 2012; KÜMPFEL et al., 2007; NEILLEY et al., 1996; TOVEY E LALLEMAND, 2010).

No presente estudo, a investigação do papel do IFN- $\alpha\beta$ R1/2 na hiperalgesia e edema causados pela injeção subcutânea de IFN- β foi realizada através da utilização de animais da linhagem A129S2/SvPas do tipo selvagem e com deleção para a subunidade IFN- $\alpha\beta$ R1 (*knockout*, IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-}). Inicialmente verificamos que animais selvagens possuem uma menor sensibilidade à hiperalgesia induzida pelo IFN- β em comparação aos animais da linhagem C57BL/6-UFSC. Este achado pode ser explicado pelo estudo de Mogil e colaboradores (1999), que verificaram que animais da linhagem A129 apresentam de fato uma menor sensibilidade em diversos parâmetros de avaliação nociceptiva, inclusive no teste de von Frey.

Apesar de parecerem apresentar uma menor sensibilidade ao efeito hiperalgésico do IFN- β , foi possível observar que tanto os animais do tipo

selvagem quanto animais IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-} desenvolveram hiperalgesia e edema após a administração do IFN- β .

Assim, podemos sugerir que os efeitos adversos promovidos pela injeção subcutânea do IFN- β não são mediados pela subunidade 1 do IFN- $\alpha\beta$ R1/2. Alguns pontos podem ser apresentados para explicar este resultado. Inicialmente, o IFN- β poderia estar induzindo hiperalgesia e edema por mecanismos independentes ao IFN- $\alpha\beta$ R1/2. Evidências na literatura mostram que IFNs do tipo I podem modular a atividade dos receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (do inglês, NMDAR) no sistema nervoso central (Di FILIPPO et al., 2016; KESSING E TYOR, 2015).

Os receptores NMDA são receptores inotrópicos ativados por ácido glutâmico (glutamato) e NMDA com importante participação em processos nociceptivos tanto agudos quanto crônicos, assim como no desenvolvimento de hiperalgesia e edema (BASBAUM et al., 2009; BEIRITH et al., 2002; BLEAKMAN et al., 2006; CAO et al., 2014; DU et al., 2003; FERRARI et al., 2014; LARSSON e BROMAN, 2011; LIU et al., 2008). Não obstante, a cetamina, um antagonista NMDA, apresenta, além de seus efeitos na indução e manutenção de anestesia, efeito anti-hiperalgésico em modelos animais de dor inflamatória (BENÍTEZ-ROSÁRIO et al., 2011; KHAJAVI et al., 2016; ROMERO E DUARTE, 2013).

Com base no exposto acima, a cetamina (100 nmol/sítio; s.c.) foi utilizada no presente estudo como pré-tratamento no intuito de tentar impedir o desenvolvimento de hiperalgesia e edema induzidos pela administração subcutânea do IFN- β . Essa estratégia se mostrou ineficaz uma vez que animais previamente tratados com cetamina continuaram a desenvolver hiperalgesia e edema após a administração do IFN- β , igualmente aos animais do grupo veículo. Também foi observado que animais pré-tratados com cetamina apresentaram um nível de edema significativamente maior meia hora após a aplicação do IFN- β . Esse efeito pró-edematogênico da cetamina, na mesma dose utilizada no presente estudo (100 nmol/sítio; s.c.) já foi anteriormente relatado por Sawynok e Reid (2002, 2003), onde foi associado à capacidade da cetamina de inibir a recaptação de aminas biogênicas e consequentemente provocar o acúmulo dessas aminas no tecido, que por sua vez podem levar à ativação de receptores de serotonina e/ou histamina, sabidamente envolvidos na produção de edema.

Uma segunda possibilidade para explicar a hiperalgesia e edema causados pelo IFN- β em animais IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-} seria que estes animais

poderiam apresentar uma compensação funcional para a expressão de um, ou mais, determinado gene importante na hiperalgesia e produção de edema que poderia estar mascarando ou distorcendo o fenótipo resultante da ausência crônica de um gene endógeno (PICCIOTTO E WICKMAN, 1998). Porém, no melhor do nosso conhecimento, não foram descritas compensações funcionais em animais IFN- $\alpha\beta$ R1^{-/-}. Além disto, a subunidade 2 do IFN- $\alpha\beta$ R1/2 poderia ser suficiente para mediar as respostas hiperalgênicas e edematogênica induzidas pelo IFN- β . Existe pelo menos um relato na literatura que demonstra que em células 11.1 deficientes de TYK2 (e com baixa expressão da IFN- $\alpha\beta$ R1) o IFN- β poderia interagir com um homodímero da IFN- $\alpha\beta$ R2, capaz de induzir a transcrição gênica precoce, mas não de provocar uma resposta antiviral (LEWERENZ et al., 1998). Corroborando esta ideia, sabe-se que a subunidade 2 é essencial para a interação do IFN-alfa com a subunidade IFN- $\alpha\beta$ R1 (JAITIN et al., 2006; KALIE et al., 2008; LEWERENZ et al., 1998; PIEHLER et al., 2012; RUNKEL et al., 1998; THOMPSON et al., 2011) e verificamos que, semelhante ao IFN- β , o IFN- α também é capaz de causar tanto hiperalgesia como edema. Porém estudos com ferramentas mais seletivas, como animais com expressão reduzida da subunidade IFN- $\alpha\beta$ R2 (p.ex. *knockout* ou *knockdown*), devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

6.2 A SINALIZAÇÃO MEDIADA VIA JAK1 NA HIPERALGESIA E EDEMA CAUSADOS PELO IFN- β

Conforme discutido anteriormente, IFNs do tipo I como o IFN- β e IFN- α se ligam ao seu receptor, IFN- $\alpha\beta$ R1/2, e promovem seus característicos efeitos antivirais, antiproliferativos e imunomodulatórios. Está bem estabelecido que a TYK2 está associada com a IFN- $\alpha\beta$ R1, enquanto que a JAK1 está associada a IFN- $\alpha\beta$ R2 (KAUR E PLATANIAS, 2013). A ativação de JAK1 é essencial para que IFN- β , e outros IFNs do tipo I, promovam seus efeitos biológicos através da via clássica, JAK-STAT, de sinalização intracelular (RANE E REDDY, 2000; SCHINDLER et al., 2007; SHIMODA et al., 1997; YANG et al., 2005; O'SHEA, 2015). Por isso, o inibidor de JAK1, PF-04965842 (300 pmol/sítio; s.c.), foi utilizado no presente estudo como uma forma de investigar mais a fundo o possível envolvimento dos mecanismos

de sinalização do IFN- β nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico após sua administração.

De acordo com a ideia de que a IFN- $\alpha\beta$ R2 poderia ser importante para a hiperalgesia e edema induzidos pelo IFN- β , foi verificado que o pré-tratamento com PF-04965842 apresentou um efeito anti-hiperalgésico parcial e precoce (observado até meia hora após administração do IFN- β), apenas nos limiares de nocicepção mecânica obtidos no teste de von Frey. Porém estudos bioquímicos (p.ex. expressão na JAK1 fosforilada no tecido injetado) devem ser realizados para verificar o grau e o tempo de duração da inibição do PF-04965842 nas condições experimentais testadas. Além disto, este resultado poderia indicar que outras vias de sinalização intracelular podem estar envolvidas com os efeitos hiperalgésico e edematogênico causados pelo IFN- β .

6.3 MECANISMOS ALTERNATIVOS PARA EXPLICAR A HIPERALGESIA E EDEMA INDUZIDOS PELO IFN- β

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na mediação das repostas hiperalgésicas e edematogênica frente à administração subcutânea de substâncias algogênicas. Estudos tem demonstrado que as vias da proteína quinase C (do inglês, PKC) e dos canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN) medeiam a hiperexcitabilidade neuronal induzida por IFN- β em neurônios do sistema nervoso central (BIEL et al., 2009; GOUGH et al., 2008; REETZ et al., 2014; REDIG et al., 2009; TSANTOULAS et al., 2016; WAXMAN E ZAMPONI, 2014).

A ativação de proteína quinase C é um dos mecanismos pelos quais estímulos nocivos podem causar hiperalgesia. Tanto estudos *in vitro* quanto *in vivo* já demonstraram os efeitos pró-nociceptivos decorrentes da ativação de PKC e os efeitos antinociceptivos dos inibidores de PKC, principalmente por processos de sensibilização periférica (FERREIRA et al., 2005; VELÁZQUEZ et al., 2007; ZHAO et al., 2011). Com base nisso, o inibidor de PKC, GF-109203X (0,3 nmol/sítio; s.c.), foi utilizado como pré-tratamento nos animais que posteriormente receberam IFN- β (1×10^3 UI/sítio; s.c.).

O inibidor de PKC GF-109203X, na dose testada, não foi capaz de prevenir os efeitos hiperalgésicos e edematogênico do IFN- β . Esses dados não corroboram estudos prévios disponíveis na literatura. A ativação da sinalização via JAK-STAT pela ligação do IFN- β ao seu receptor, IFN- $\alpha\beta$ R1/2, resulta na ativação de outras cascatas de sinalização, inclusive

aquelas mediadas por PKC, como a modulação da atividade de canais iônicos e promoção de excitabilidade neuronal, importantes efeitos que entre outros processos, também estão envolvidos no desenvolvimento de hiperalgesia (FERREIRA et al., 2005; GOUGH et al., 2008; REETZ et al., 2014; REDIG et al., 2009; WAXMAN E ZAMPONI, 2014). Ainda, essa disparidade nos resultados poderia ser atribuída ao fato de que a ativação da PKC, mediada pela cascata de sinalização ativada pelo IFN- β e sua consequente atividade sobre canais iônicos e promoção de excitabilidade neuronal, é mais importante no SNC como mostrado por Reetz et al. (2014) em neurônios piramidais. Além disso, em se tratando do IFN- β , a atividade da PKC na periferia parece estar mais relacionada à regulação de sua produção assim como à regulação da interação do IFN- β com seu receptor em células não-neuronais, como macrófagos (GORDON et al., 2012; JOHNSON et al., 2007; IVASHKIV E DONLIN, 2014; SEHGAL et al., 1987; WANG et al., 2010).

Um segundo alvo importante a ser considerado como possível responsável pelas ações hiperalgésicas e edematogênica do IFN- β são os canais HCN. Estes canais, HCN1-4, atuam principalmente regulando a atividade neuronal no SNC e SNP, e também de células cardíacas (BIEL et al., 2009). De fato, canais HCN se encontram expressos em neurônios sensoriais do SNP, inclusive no DRG, com destaque para canais HCN2 expressos em abundância em fibras nociceptivas do tipo C e A δ , sabidamente envolvidas no processo nociceptivo (ACOSTA et al., 2012; CHAPLAN et al., 2003; CHO et al., 2009; EMERY et al., 2011; KOURANOVA et al., 2008; TIBBS et al., 2016; TU et al., 2004; WENG et al., 2012).

Com base nas evidências supracitadas, o inibidor não seletivo de canais HCN, ivabradina (1 nmol/sítio; s.c.), foi utilizado no presente estudo. No entanto, animais pré-tratados com ivabradina desenvolveram hiperalgesia e edema de forma semelhante aos animais do grupo veículo após a administração do IFN- β . Além disso, os animais do grupo ivabradina apresentaram ainda uma tendência a desenvolver um edema significativamente maior meia hora após o IFN- β ter sido injetado. Esses dados não vão ao encontro de achados prévios publicados na literatura, que demonstraram o potencial efeito antinociceptivo da ivabradina, e ZD7288 (um

inibidor de canais HCN menos seletivo), em diversos modelos de dor inflamatória (DJOUHRI et al., 2015; EMERY et al., 2011; LUO et al., 2007; SCHNORR et al., 2014; YOUNG et al., 2014) e dor neuropática (CHAPLAN et al., 2003; EMERY et al., 2011; LUO et al., 2007; MATOS et al., 2015; NOH et al., 2014; SUN et al., 2005; TAKASU et al., 2010; YOUNG et al., 2014). Não obstante, essa diferença nos resultados poderia ser explicada, pelo menos em parte, pelas diferentes condições experimentais observadas nos estudos quanto ao modelo animal utilizado (se ratos ou camundongos, e diferença nas linhagens e modificações gênicas das mesmas), modelos usados para indução de dor inflamatória e/ou dor neuropática, além de variabilidade nas doses e vias de administração escolhidas.

É válido ressaltar que apenas Luo et al. (2007) e Schnorr et al. (2014) administraram seus tratamentos (ZD7288) pela via subcutânea (na região plantar da pata dos animais), em doses similares (30 μ M e 0.025M, respectivamente), e observaram efeitos anti-hiperalgésicos em modelos de dor inflamatória e dor neuropática. Adicionalmente, o próprio IFN- β poderia estar interferindo com a ação da ivabradina sobre canais HCN, conforme previamente mostrado por Stadler et al. (2014) e Reetz et al. (2014), os quais demonstraram que o IFN- β pode regular a atividade excitatória de canais HCN.

Além da PKC e canais HCN, uma outra alternativa a ser considerada como responsável por mediar a hiperalgesia e edema induzidos pela aplicação subcutânea de IFN- β seria o papel de mastócitos e os efeitos desencadeados por seu processo de degranulação. Já está bem demonstrado na literatura que os produtos da degranulação mastocitária (aminas biogênicas, citocinas, metabólitos lipídicos, neuropeptídeos e óxido nítrico) são capazes de promover a instalação de processos hiperalgésicos e desenvolvimento de edema. (CHATTERJEA E MARTINOV, 2015; GALLI et al., 2005; GURISH E BOYCE 2002; McNEIL et al., 2015; NORMAN et al., 2008; REN E DUBNER, 2010; VERRI et al., 2006; WOOLF, 2010). Moléculas estabilizadoras de mastócitos (impedem a degranulação), como o cromoglicato, já foram descritas como sendo capazes de prevenir o desenvolvimento ou reduzir a intensidade da hiperalgesia e edema em diferentes modelos animais de dor (Le FILLIATRE et al., 2001; PARADA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2011, 2013; VICENT et al., 2013).

Dessa forma, o possível envolvimento de mastócitos nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico provocados pela administração subcutânea de IFN- β foi investigado no presente estudo pelo pré-tratamento dos animais

com o estabilizador de mastócitos cromoglicato (4 nmol/sítio; s.c.). Conquanto, essa estratégia se mostrou ineficaz, e animais do grupo cromoglicato desenvolveram hiperalgesia e edema semelhantemente aos animais do grupo veículo, após a administração de IFN- β . Interessantemente, o IFN- β já foi descrito como sendo capaz de promover efeitos inibitórios sobre mastócitos tanto em relação à degranulação (BISSONNETTE E BEFUS, 1990; SWIETER et al., 1989) quanto ao recrutamento de neutrófilos (DIETRICH et al., 2010), assim como sobre o crescimento de mastócitos (KONNO et al., 1993), excluindo a possibilidade do envolvimento desse tipo celular nos efeitos induzidos pela administração subcutânea de IFN- β que foram observados no presente estudo.

Alternativamente, Trevisan et al. (2013) demonstraram, em um modelo animal de nocicepção abdominal, que o cromoglicato não foi capaz de prevenir a resposta nociceptiva induzida pela administração intraperitoneal de capsaicina (agonista TRPV1) e alil isotiocianato (agonista TRPA1). Com base nisso, pode-se supor que os efeitos hiperalgésicos e edematogênico do IFN- β poderiam estar sendo mediados pela ativação de receptores TRPV1 e TRPA1, sabidamente envolvidos na exacerbação do processo nociceptivo que leva à hiperalgesia, assim como na produção de edema.

6.4 PAPEL DOS RECEPTORES TRPV1 E TRPA1 E DAS FIBRAS NOCICEPTIVAS NOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E EDEMATOGÊNICO DO IFN- β

O processo de percepção de estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e químicos), denominado nocicepção, é mediado por fibras periféricas sensoriais especializadas, denominadas nociceptores (APKARIAN et al., 2005; BASBAUM et al., 2009; DUBIN E PATAPOUTIAN, 2010; JULIUS E BASBAUM, 2001; SHERRINGTON, 1906; VAY et al., 2012; WOOD E PERL, 1999; WOOLF E MA, 2007). A responsividade dessas fibras frente à estímulos nocivos é regulada pela ativação de diferentes tipos de receptores nelas co-expressos, dentre os quais se destacam no presente estudo os receptores de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1) e receptores de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1). Receptores TRPV1 e TRPA1 são canais de cátions não-seletivos que caracteristicamente são ativados pela estimulação química

com capsaicina e alil isotiocianato, respectivamente. A ativação desses receptores em nociceptores que inervam órgãos como a pele favorece a transdução de uma miríade de estímulos nocivos (TRPV1 – térmicos (calor) e químicos; TRPA1 – mecânicos, químicos e térmicos (frio)) (BASBAUM et al., 2009; CATERINA et al., 1997, 2000; DUBIN E PATAPOUTIAN, 2010; GEPPETI et al., 2008; HINMAN et al., 2006; JULIUS et al., 2013; STORY et al., 2003; TÓTH et al., 2014; VAY et al 2012). Há diversas evidências da participação desses receptores em respostas hiperalgésicas e edematogênicas após a administração subcutânea de substâncias algogênicas como formalina, IL-1 β , TNF- α , entre outros (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006; CATERINA et al., 1997, 2000; FERNANDES et al., 2011; JORDT et al., 2004; McMAHON et al., 2015; McNAMARA et al., 2007; PINHO-RIBEIRO et al., 2017; OBREJA et al., 2002). Interessantemente, a participação de receptores TRPV1 mediando dor no local de injeção (como efeito adverso de alguns fármacos) também já foi demonstrada (SCHILLERS et al., 2016).

Com bases nas informações previamente descritas, a possível participação dos receptores TRPV1 e/ou TRPA1, assim como de fibras sensoriais nociceptivas, nos efeitos hiperalgésicos e edematogênico produzidos pela administração subcutânea do IFN- β foi investigada através da utilização de antagonismo farmacológico dos receptores e ablação de fibras sensoriais nociceptivas TRPV1⁺/TRPA1⁺, pelo tratamento sistêmico com resiniferatoxina (potente agonista TRPV1). A estratégia de pré-tratamento com os antagonistas TRPV1 e TRPA, SB-366791 (1 nmol/sítio; s.c.) e HC-030031 (3 nmol/sítio; s.c.), respectivamente, não preveniu a hiperalgesia ou edema causados pelo IFN- β . Esses resultados não corroboram dados recentemente publicados na literatura, onde pacientes com esclerose múltipla que fazem uso do IFN- β apresentaram maior propensão ao desenvolvimento de dor relacionada ao tratamento por possuírem um polimorfismo no gene que codifica a expressão do receptor TRPV1, indicando uma possível participação do mesmo nos efeitos adversos investigados no presente estudo (BUTTARI et al., 2017). A ablação de fibras sensoriais nociceptivas TRPV1⁺/TRPA1⁺ não foi capaz de proteger os animais dos efeitos hiperalgésicos do IFN- β . Considerando esses resultados, pode-se sugerir que o IFN- β estaria exercendo seus efeitos hiperalgésicos através de outros transdutores de estímulos nocivos que não foram investigados neste estudo, mas que são comumente expressos em fibras periféricas nociceptivas, como receptores purinérgicos e canais iônicos.

Interessantemente, foi observado no presente estudo que animais submetidos ao tratamento com RTX desenvolveram edema de forma

significativamente maior quando comparados aos animais do grupo veículo. Apesar de contraditório à maioria dos estudos previamente publicados (PECZE et al., 2009; SANDOR et al., 2009; TREVISAN et al., 2013), esse efeito pró-edematogênico do tratamento sistêmico com RTX foi anteriormente relatado por Helyes et al. (2004) e Borbély et al. (2015), que observaram níveis mais elevados de edema em ratos pré-tratados com RTX após a administração de CFA ou com o auto-anticorpo artrítogênico K/BxN, respectivamente, e esse efeito foi atribuído à uma maior atividade da enzima mieloperoxidase, maior ativação de células inflamatórias e maior produção de espécies reativas de oxigênio.

Apesar de termos conseguido fazer a padronização de um modelo animal de nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea de IFN- β , não fomos capazes, pelo menos até o momento, de identificar os mecanismos responsáveis por mediar tais efeitos adversos.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos a partir do presente estudo, pode-se concluir que:

- a. O IFN- β , quando administrado por uma via e em dose compatível com a clínica, promove hiperalgesia e edema em camundongos, o que possibilita a utilização dos mesmos como modelo animal para a investigação dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de tais efeitos adversos, assim como observado em humanos;
- b. Um outro IFN do tipo I, IFN- α , também é capaz de induzir hiperalgesia e edema após sua administração subcutânea;
- c. O desenvolvimento de hiperalgesia e edema induzidos pela injeção subcutânea do IFN- β acontece de forma independente à sua ligação à subunidade 1 do seu receptor (IFN- $\alpha\beta$ R1), mas depende parcialmente da ativação de sinalização intracelular via JAK1;
- d. A hiperalgesia mecânica e edema provocados pela administração subcutânea do IFN- β não são mediados pela ativação de receptores TRPV1 ou TRPA1;
- e. Fibras sensoriais nociceptivas TRPV1⁺/TRPA1⁺ também não participam da resposta hiperalgésica e edematogênica promovida pela injeção subcutânea do IFN- β ;
- f. A ativação de PKC, canais HCN, receptores NMDA e mastócitos não contribui para a hiperalgesia e edema produzidos pela administração subcutânea do IFN- β .

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A proposta do presente estudo foi a de caracterizar um modelo animal de nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do IFN- β , o qual possa ser utilizado na investigação dos mecanismos responsáveis pela mediação de tais efeitos adversos. Apesar de termos conseguido efetuar a padronização do modelo, é importante ressaltar que o mesmo apresenta limitações, que podem e devem ser superadas.

Primeiramente, os animais submetidos ao tratamento com IFN- β não apresentavam alterações patológicas (incluindo sensoriais) associadas à esclerose múltipla. Além disso, foram utilizados ao longo de todo estudo animais machos, enquanto na clínica uma maior proporção de mulheres é afetada pela esclerose múltipla em relação a homens (3:1), que consequentemente apresentam dor e edema em maior proporção. Adicionalmente, apenas os efeitos adversos locais (dor e edema) produzidos pelo IFN- β foram investigados no presente estudo, contudo, pacientes com esclerose múltipla também apresentam importantes efeitos adversos sistêmicos (dor de cabeça, mialgia, febre), que se investigados contribuiriam para uma melhor caracterização do modelo proposto. Dessa forma, para melhoria das validades de constructo e de face do presente modelo, pretendemos induzir em animais fêmeas as alterações patológicas características da esclerose múltipla através da utilização da encefalomielite autoimune experimental, um válido modelo animal de esclerose múltipla. Também pretendemos avaliar os animais quanto ao surgimento de efeitos adversos sistêmicos, além dos efeitos locais investigados neste estudo, decorrentes da administração subcutânea do IFN- β , assim como investigar os possíveis mecanismos envolvidos na mediação de tais efeitos. Uma outra limitação deste estudo é que não tivemos tempo hábil para realizar análises bioquímicas e moleculares que fornecessem suporte para os achados comportamentais relatados. Além disso, o presente estudo não conseguiu fornecer informações quanto à validade preditiva do modelo proposto, necessitando melhorias no desenho experimental quanto à utilização de controles positivos como o anestésico local EMLA® e vitamina K, que foram previamente mostrados como tendo efeitos anti-hiperalgésicos frente à dor

induzida por IFN- β (BUHSE, 2006; LANZILLO et al., 2015), e também controles positivos para os antagonistas e inibidores testados. Conjuntamente, a resolução das limitações descritas contribuiria para o estabelecimento de um modelo animal mais robusto e fidedigno em relação à clínica.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, C et al. HCN1 and HCN2 in Rat DRG Neurons: Levels in Nociceptors and Non-Nociceptors, NT3-Dependence and Influence of CFA-Induced Skin Inflammation on HCN2 and NT3. **PLoS One**. v. 7, n. 12, Dez, p. 1-17, 2012.

AGASHIVALA, N et al. Compliance to fingolimod and other disease modifying treatments in multiple sclerosis patients, a retrospective cohort study. **BMC Neurology**. v. 13, n. 138, Out, p. 1-9, 2013.

APKARIAN, AV et al. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **European Journal of Pain**. v. 9, n. 4, Ago, p. 463-484, 2005.

ARMITAGE, P; BERRY, G. The planning os statistical investigations. em: **Statistical methods in medical research**. 2.ed. Oxford, Blackwell, 1987. p.179-85.

ARNOLDUS, JHA et al. Quality of life during the first 6 months of interferon-beta treatment in patients with MS. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 6, n. 5, Out, p. 338-342, 2000.

ASSELIN-PATUREL, C. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. **Nature Immunology**. v. 2, n. 12, Dez, p. 1144-1150, 2001.

ATKINS, S et al. A pooled analysis of injection site-related adverse events in patients with schizophrenia treated with olanzapine long-acting injection. **BMC Psychiatry**. v. 14, n. 7, Jan, p. 1-5, 2014.

AUSTIN, PJ; WU, A; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats. **Journal of Visualized Experiments**. n. 61, Mar, p. 3393, 2012.

BACH, EA; AGUET, M; SCHREIBER, RD. The IFN γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annual Review of Immunology**. v. 15, Abr, p. 563-591, 1997.

BALAK, DM et al. Cutaneous adverse events associated with disease-modifying treatment in multiple sclerosis: a systematic review. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 18, n. 12, Fev, p. 1705-1717, 2012.

BANDELL, M et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**. v. 41, n. 6, Mar, p. 849-857, 2004.

BARBARA, G et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**. v. 126, n. 3, Mar, p. 693-702, 2004.

BARNES, B; LUBYOVA, B; PITHA, PM. On the role of IRF in host defense. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 22, n. 1, Jan, p. 59-71, 2002.

BASBAUM, AI et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, Out, p. 267-284, 2009.

BAUM, K et al. Comparison of injection site pain and injection site reactions in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1a or 1b. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 13, n. 9, Nov, p. 1153-1160, 2007.

BAUTISTA, DM et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**. v. 124, n. 6, Mar, p. 1296-1282, 2006.

BEER, K et al. The prevalence of injection-site reactions with disease-modifying therapies and their effect on adherence in patients with multiple

sclerosis: an observational study. **BMC Neurology**. v. 11, n. 144, Nov, p. 1-7, 2011.

BEIRITH, A; SANTOS, AR; CALIXTO, JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**. v. 924, n. 2, Jan, p. 219-228, 2002.

BENÍTEZ-ROSARIO, MA et al. A strategy for conversion from subcutaneous to oral ketamine in cancer pain patients: effect of a 1:1 ratio. **Journal of Pain and Symptom Management**. v. 41, n. 6, Jun, p. 1098-1105, 2011.

BIEL, M et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. **Physiological Reviews**. v. 89, n. 3, Jul, p. 847-885, 2009.

BIRÓ, T et al. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. **Blood**. v. 91, n. 4, Fev, p. 1332-1340, 1998.

BISCHOFF, SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. **Nature Reviews Immunology**. v. 7, n. 2, Fev, p. 93-104, 2007.

BISSONNETTE, EY; BEFUS, AD. Inhibition of mast cell-mediated cytotoxicity by IFN-alpha/beta and -gamma. **The Journal of Immunology**. v. 145, n. 10, Nov, p. 3385-3390, 1990.

BLEAKMAN, D; ALT, A; NISENBAUM, ES. Glutamate receptors and pain. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 17, n. 5, Out, p. 592-604, 2006,

BORBÉLY, E et al. Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 45, Mar, p. 50-59, 2015.

BORDEN, EC et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 6, n. 12, Dez, p. 975-990, 2007.

BRITTAİN, JM et al. Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca²⁺ channel complex. **Nature Medicine**. v. 17, n. 7, Jun, p. 822-829, 2011.

BROWNEE, WJ et al. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. **Lancet**. v. 16, n. 30959-x, Nov, p. 1-11, 2016.

BUCHWALDER, PA et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of IFN-β1a in Healthy Volunteers. **Journal of Interferon and Cytokine Research**. v. 20, n. 10, Out, p. 857-866, 2000.

BUHSE, M. Efficacy of EMLA Cream to Reduce Fear and Pain Associated with Interferon Beta-1a Injection in Patients with Multiple Sclerosis. **Journal of Neuroscience Nursing**. v. 38, n. 4, Ago, p. 222-226, 2006.

BUTTARI, F et al. TRPV1 polymorphisms and risk of interferon β-induced flu-like syndrome in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**. v. 305, Abr, p. 172-174, 2017.

BUTTMANN, M; GOEBELER, M; RIECKMANN, P. Local pain during REBIF injection is not due to acidic pH. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**. v. 75, n. 7, Jul, p. 1078, 2004.

CANTELL, K et al. Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. **Methods in Enzymology**. v. 1981, n. Pt A, p. 29-38, 1981a.

CANTELL, K; HIRVONEN, S; KOISTINEN, V. Partial purification of human leukocyte interferon on a large scale. **Methods in Enzymology**. v. 1981, n. Pt A, p. 499-505, 1981b.

CAO, DL et al. Chemokine CXCL1 enhances inflammatory pain and increases NMDA receptor activity and COX-2 expression in spinal cord neurons via activation of CXCR2. **Experimental Neurology**. v. 261, Nov, p. 328-336, 2014.

CATERINA, MJ et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**. v. 288, n. 5464, Abr, p. 306-313, 2000.

CATERINA, MJ et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. v. 389, n. 6653, Out, p. 816-824, 1997.

CHA, L et al. Interferon-alpha, immune activation and immune dysfunction in treated HIV infection. **Clinical & Translational Immunology**. v. 3, n. 2, Fev, p. 1-6, 2014.

CHAPLAN, SR et al. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**. v. 23, n. 4, Fev, p. 1169-1178, 2003.

CHAPLAN, SR et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 53, n. 1, Jul, p. 55-63, 1994.

CHARCOT, JM. Histologie de lá sclérose em plaques. **Gazette des Hopitaux**. v. 41, p. 554-555, 1868.

CHATTERJEA, D; MARTINOV, T. Mast cells: versatile gatekeepers of pain. **Molecular Immunology**. v. 63, n. 1, Jan, p. 38-44, 2015.

CHEN, J; BAIG, E; FISH, EN. Diversity and relatedness among the type I interferons. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 24, n. 12, Dez, p. 687-698, 2004.

CHO, HJ et al. Inflammation-Induced Increase in Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated Channel Protein in Trigeminal Ganglion Neurons and the Effect of Buprenorphine. **Neuroscience**. v. 162, n. 2, Maio, p. 453-461, 2009.

CHOI, J et al. Pharmacologic Blockade of JAK1/JAK2 Reduces GvHD and Preserves the Graft-Versus-Leukemia Effect. **PLoS One**. v. 9, n. 10, Out, p. 1-6, 2014.

CLERICO, M; CONTESSA, G; DURELLI, L. Interferon- β 1a for the treatment of multiple sclerosis. **Expert Opinion on Biological Therapy**. v. 7, n. 4, Abr, p. 535-542, 2007.

COLES, AJ et al. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**. v. 253, n. 1, Jan, p. 98-108, 2006.

COMI, G et al. Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. **Lancet**. v. 371, n. 9630, Jun, p. 2085-2092, 2008.

COMI, G; RADAELLI, M; SORENSEN, S. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. **Lancet**. v. 16, n. 32388-1, Nov, p. 1-10, 2016.

COMPSTON, A; COLES, A. Multiple sclerosis. **Lancet**. v. 372, n. 9468, Out, p. 1502-1517, 2008.

CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA**. BRASÍLIA-DF, p. 1-54, 2013.

COUSINS, MJ; LYNCH, ME. The Declaration Montreal: access to pain management is a fundamental human right. **Pain**. v. 152, n. 12, Dez, p. 2673-2674, 2011.

CROZE, E et al. Interferon-beta-1b-induced short- and long-term signatures of treatment activity in multiple sclerosis. **The Pharmacogenomics Journal**. v. 13, n. 5, Out, p. 443-451, 2013.

DARNELL, JE Jr. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 18, n. 8, Ago, p. 549-554, 1998.

DARNELL, JE Jr; KERR, IM; STARK, GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**. v. 264, n. 5164, Jun, p. 1415-1421, 1994.

DAVIDSON, EM; CARLTON, SM. Intraplantar injection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. **Brain Research**. v. 785, n. 1, Feb, p. 136-142, 1998.

DAWSON, JW. The histology of Disseminated Sclerosis. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**. v. 50, n. 18, Mar, p. 517-740, 1916.

DENDROU, CA; FUGGER, L; FRIESE, MA. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**. v. 15, Ago, p. 545-558, 2015.

DER, SD et al. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v. 94, n. 7, Abr, p. 3279-3283, 1997.

DER, SD et al. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v. 95, n. 26, Dez, p. 15623-15628, 1998.

DEVONSHIRE, V et al. The Global Adherence Project (GAP): a multicenter observational study on adherence to disease-modifying therapies in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **European Journal of Neurology**. v. 18, n. 1, Jan, p. 69-77, 2011.

DHIB-JABULT, S; MARKS, S. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. **Neurology**. v. 74, n. 1, Jan, p. S17-S24, 2010.

Di FILIPPO, M et al. Interferon- β 1a modulates glutamate neurotransmission in the CNS through CaMKII and GluN2A-containing NMDA receptors. **Neuropharmacology**. v. 100, Jan, p. 98-105, 2016.

DIETRICH, N et al. Mast cells elicit proinflammatory but not type I interferon responses upon activation of TLRs by bacteria. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v. 107, n. 19, Maio, p. 8748-8753, 2010.

DIXON, WJ. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 20, Abr, p. 441-462, 1980.

DJOUHRI, L et al. Persistent hindlimb inflammation induces changes in activation properties of hyperpolarization-activated current (I_h) in rat C-fiber nociceptors in vivo. **Neuroscience**. v. 301, Ago, p. 121-133, 2015.

DU, J et al. N-methyl-D-aspartate-induced excitation and sensitization of normal and inflamed nociceptors. **Neuroscience**. v. 118, n. 2, p. 547-562, 2003.

DUBIN, AE; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, n. 11, Nov, p. 3760-3772, 2010.

EMERY, C et al. HCN2 ion channels play a central role in inflammatory and neuropathic pain. **Science**. v. 333, n. 6048, Set, p. 1462-1466, 2011.

FARAZIFARD, R et al. Eye-wiping test: a sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. **Brain Research – Brain Research Protocols**. v. 16, n. 1-3, Dez, p. 44-49, 2005.

FERJAN, I; LIPNIK-STANGELJ, M. Chronic Pain Treatment: The Influence of Tricyclic Antidepressants on Serotonin Release and Uptake in Mast Cells. **Mediators of Inflammation**. v. 2013, n. 340473, Abr, p. 1-7, 2013.

FERNANDES, ES et al. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor

necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**. v. 63, n. 3, Mar, p. 819-829, 2011.

FERRARI, LF et al. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v. 111, n. 51, Dez, p. 18363-18368, 2014.

FERREIRA, J et al. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. **Pain**. v. 117, n. 1-2, Set, p. 171-181, 2005.

FISCHER, MJM et al. The General Anesthetic Propofol Excites Nociceptors by Activating TRPV1 and TRPA1 Rather than GABA_A Receptors. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 45, Nov, p. 34781-34792, 2010.

FOLEY, PL et al. Prevalence and natural history of pain in adults with multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis. **Pain**. v. 154, n. 5, Dez, p. 632-642, 2013.

FREEDMAN, MS. Long-term follow-up of clinical trials of multiple sclerosis therapies. **Neurology**. v. 76, n. 1, Jan, p. S26-S34, 2011.

FROHMAN, EM; RACKE, MK; RAINE, CS. Multiple Sclerosis – The Plaque and Its Pathogenesis. **The New England Journal of Medicine**. v. 354, n. 9, Mar, p. 942-955, 2006.

GALLI, SJ et al. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annual Reviews of Immunology**. v. 23, Abr, p. 749-786, 2005.

GEORGE, PM et al. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 135, n. 1, Jul, p. 44-53, 2012.

GEPPETTI, P et al. The concept of neurogenic inflammation. **British Journal of Urology International – BJUI**. v. 101, n. s3, Mar, p. 2-6, 2008.

GERLACH, N et al. Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo. **European Journal of Immunology**. v. 39, n. 1, Jan, p. 136-146, 2009.

GESSANI, S et al. Bacterial lipopolysaccharide and gamma interferon induce transcription of beta interferon mRNA and interferon secretion in murine macrophages. **Journal of Virology**. v. 63, n. 6, Jun, p. 2785-2789, 1989.

GIBBERT, K et al. IFN- α subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy. **British Journal of Pharmacology**. v. 168, n. 5, Mar, p. 1048-1058, 2013.

GOEB, JL et al. Psychiatric side effects of interferon-beta in multiple sclerosis. **European Psychiatry**. v. 21, n. 3, Abr, p. 186-193, 2006.

GONZÁLEZ-NAVAJAS, JM et al. Immunomodulatory functions of type I interferons. **Nature Reviews Immunology**. v. 12, n. 2, Jan, p. 125-135, 2012.

GORDON, RA et al. The interferon signature and STAT1 expression in rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages are induced by tumor necrosis factor α and counter-regulated by the synovial fluid microenvironment. **Arthritis and Rheumatism**. v. 64, n. 10, Out, p. 3119-3128, 2012.

GOSWAMI, SC et al. Molecular Signatures of Mouse TRPV1-lineage Neurons Revealed by RNA-Seq Transcriptome Analysis. **Journal of Pain**. v. 15, n. 12, Out, p. 1338-1359, 2014.

GOTTBERG, K; GARDULF, A; FREDRIKSON, S. Interferon-beta treatment for patients with multiple sclerosis: the patients' perceptions of the side-effects. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 6, n. 5, Out, p. 349-354, 2000.

GOUGH, DJ et al. IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT? **Cytokine & Growth Factors Reviews**. v. 19, n. 5-6, Out, p. 383-394, 2008.

GRAPHPAD. QuickCalcs – Outlier calculator, 2016. Disponível em:<
<https://graphpad.com/quickcalcs/grubbs1>>. Acesso em: 30 de nov. 2016.

GURISH, MF; BOYCE, JA. Mast cell growth, differentiation, and death. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. v. 22, n. 2, Abr, p. 107-118, 2002.

HAFLER, DA. Multiple sclerosis. **Immunological reviews**. v. 204, Mar, p. 208-231, 2005.

HARGREAVES, K et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**. v. 32, n. 1, Jan, p. 77-88, 1988.

HARRIS, C et al. Injection-Site Pain in Patients with Multiple Sclerosis: Interferon Beta-1b Versus Interferon Beta-1a. **International Journal of MS Care**. v. 7, n. 4, p. 132-136, 2005.

HAUSER, SL; CHAN, JR; OKSENBERG, JR. Multiple sclerosis: Prospects and promise. **Annals of Neurology**. v. 74, n. 3, Set, p. 317-327, 2013.

HAVRDOVA, E et al. Freedom from disease activity in multiple sclerosis. **Neurology**. v. 74. N. S3, Abr, p. S3-7, 2010.

HELYES, Z et al. Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Somatostatin Released From Capsaicin-Sensitive Sensory Nerve Terminals in a Freund's Adjuvant-Induced Chronic Arthritis Model in the Rat. **Arthritis and Rheumatism**. v. 50, n. 5, Maio, p. 1677-1685, 2004.

HENLE, W. Interference phenomena between animal viruses: a review. **Journal of Immunology**. v. 64, n. 3, Mar, p. 203-236, 1950.

HERTZOG, P; FORSTER, S; SAMARAJIWA, S. Systems biology of interferon responses. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 31, n. 1, Jan, p. 5-11, 2011.

HERTZOG, P; WILLIAMS, BR. Fine tuning type I interferon responses. **Cytokine & Growth Factors Reviews**. v. 24, n. 3, Jun, p. 217-225, 2013.

HINMAN, A et al. TRP channel activation by reversible covalent modification. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v. 103, n. 51, Dez, p. 19564-19568, 2006.

HOFFMEISTER, C et al. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. **Pain**. v. 152, n. 8, Ago, p. 1777-1788, 2011.

HU, X et al. COMPARE: Pharmacokinetic profiles of subcutaneous peginterferon beta-1a and subcutaneous interferon beta-1a over 2 weeks in healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 82, n. 2, Maio, p. 380-388, 2016.

HURTADO-GUERRERO, I et al. Activation of the JAK-STAT Signaling Pathway after In Vitro Stimulation with IFN β in Multiple Sclerosis Patients According to the Therapeutic Response to IFN β . **PLoS One**. v. 12, n. 1, Jan, p. 1-19, 2017.]

IHLE, JN. Cytokine receptor signalling. **Nature**. v. 377, n. 6550, Out, p. 591-594, 1995.

ISAACS, A; LINDENMANN, J. Virus Interference. I. The Interferon. **Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences**. v. 147, n. 927, Set, p. 258-267, 1957a.

ISAACS, A; LINDENMANN, J; VALENTINE, RC. Virus Interference. II. Some properties of interferon. **Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences**. v. 147, n. 927, Set, 268-273, 1957.

IVASHKIV, LB; DONLIN, LT. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**. v. 14, n. 1, Jan, p. 36-49, 2014.

IWASAKI, A. A virological view of innate immune recognition. **Annual Reviews of Microbiology**. v. 66, Out, p. 177-196, 2012.

JACOBS, LD et al. A phase 111 trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-relmitting multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 1, n. 2, Jun, p. 118-135, 1995.

JACOBS, LD et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. **Annals of Neurology**. v. 39, n. 3, Mar, p. 285-294, 1996.

JAECKEL, E et al. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. **The New England Journal of Medicine**. v. 345, n. 20, Nov, p. 1452-1457, 2001.

JAITIN, DA et al. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN- α 2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN- β . **Molecular and Cell Biology**. v. 26, n. 5, Mar, p. 1888-1897, 2006.

JANKOVIC, SM. Injectable interferon beta-1b for the treatment of relapsing forms of multiple sclerosis. **Journal of Inflammation Research**. v. 3, Mar, p. 25-31, 2010.

JOHNSON, J et al. Protein kinase C α is involved in interferon regulatory factor 3 activation and type I interferon- β synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 20, Maio, p. 15022-15032, 2007.

JORDT, SE et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**. v. 427, n. 6971, Jan, p. 260-265, 2004.

JULIUS, D. TRP Channels and Pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 29, Out, p. 355-384, 2013.

JULIUS, D; BASBAUM, AI. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, n. 6852, Set, p. 203-210, 2001.

KAGAN, L et al. Interspecies Scaling of Receptor-Mediated Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Type I Interferons. **Pharmaceutical Research**. v. 27, n. 5, Maio, p. 920-932, 2010.

KALIE, E et al. The stability of the ternary interferon-receptor complex rather than the affinity to the individual subunits dictates differential biological activities. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, n. 47, Nov, p. 32925-32936, 2008.

KALINKE, U; PRINZ, M. Endogenous, or therapeutically induced, type I interferon responses differentially modulate Th1/Th17-mediated autoimmunity in the CNS. **Immunology and Cell Biology**. v. 90, n. 5, Maio, p. 505-509, 2012.

KASPER, LH; REDER, AT. Immunomodulatory activity of interferon-beta. **Annals of Clinical and Translational Neurology**. v. 1, n. 8, Jul, 2014.

KAUR S; PLATANIAS, LC. IFN- β -specific signaling via a unique IFNAR1 interaction. **Nature Immunology**. v. 14, n. 9, Set, p. 884-885, 2013.

KESSING, CF; TYOR, WR. Interferon- α induces neurotoxicity through activation of the type i receptor and the Glun2a subunit of the NMDA receptor. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 35, n. 4, Abr, p. 317-324, 2015.

KHAJAVI, MR et al. Combined Ketamine-Tramadol Subcutaneous Wound Infiltration for Multimodal Postoperative Analgesia: A Double-Blinded, Randomized Controlled Trial after Renal Surgery. **Anaesthesiology and Pain Medicine**. v. 6, n. 5, Jul, p. e37778, 2016.

KIESEIER, BC. The Mechanism of Action of Interferon- β in Relapsing Multiple Sclerosis. **CNS Drugs**. v. 25, n. 6, Jun, 2011.

KILKENNY, C et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**. v. 8, n. 6, Jun, p. 1-5, 2010.

KING, NB; FRASER, V. Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. **PLoS Medicine**. v. 10, n. 4, Abr, 1-4, 2013.

KLAUER, T; ZETTL, UK. Compliance, adherence, and the treatment of multiple sclerosis. **Journal of Neurology**. v. 255, n. 6, Dez, p. 87-92, 2008.

KNIGHT, E Jr. Heterogeneity of purified mouse interferons. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 250, n. 11, Jun, p. 4139-4144, 1975.

KODA, H; MIZUMURA, K. Sensitization to mechanical stimulation by inflammatory mediators and by mild burn in canine visceral nociceptors in vitro. **Journal of Neurophysiology**. v. 87, n. 4, Abr, p. 2043-2051, 2002.

KOLB-MÄURER, A; GOEBELER, M; MÄURER, M. Cutaneous Adverse Events Associated with Interferon- β Treatment of Multiple Sclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, n. 7, Jul, p. 14951-14960, 2015.

KONNO, S et al. Inhibitory effect of interferon-beta on mouse spleen-derived mast cells. **Mediators of Inflammation**. v. 2, n. 3, p. 243-246, 1993.

KORNEK, B et al. Evaluation of the 2010 McDonald multiple sclerosis criteria in children with a clinically isolated syndrome. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 18, n. 12, Dez, p. 1768-1774, 2012.

KOTENKO, SV et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature Immunology**. v. 4, n. 1, Jan, p. 69-77, 2003.

KOURANOVA, EV et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA and protein expression in large versus small diameter dorsal root ganglion neurons: correlation with hyperpolarization-activated current gating. **Neuroscience**. v. 153, n. 4, Jun, p. 1008-1019, 2008.

KOUTSOURAKI, E; COSTA, V; BALOYANNIS, S. Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review. **International Review of Psychiatry**. v. 22, n. 1, Mar, p. 2-13, 2010.

KÜMPFEL, T et al. Time of interferon- β 1a injection and duration of treatment affect clinical side effects and acute changes of plasma hormone and cytokine levels in multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 13, n. 9, Nov, p. 1138-1145, 2007.

LAMKEN, P et al. Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ifnar1. **Journal of Molecular Biology**. v. 350, n. 3, Jul, p. 476-488, 2005.

LANZILLO, R et al. Vitamin K cream reduces reactions at the injection site in patients with relapsing– remitting multiple sclerosis treated with subcutaneous interferon beta – VIKING study. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 21, n. 9, Ago, p. 1215-1216, 2015.

LARSSON, M; BROMAN, J. Synaptic Plasticity and Pain: Role of Ionotropic Glutamate Receptors. **The Neuroscientist**. v. 17, n. 3, Jun, p. 256-273, 2011.

Le FILLIATRE, G et al. Cyclo-Oxygenase and Lipoxygenase Pathways in Mast Cell Dependent-Neurogenic Inflammation Induced by Electrical Stimulation of the Rat Saphenous Nerve. **British Journal of Pharmacology**. v. 132, n. 7, Abr, p. 1581-1589, 2001.

LEE, JH; KIM, SE; LEE, AY. Effects of interferon- α 2b on keloid treatment with triamcinolone acetonide intralesional injection. **International Journal of Dermatology**. v. 47, n. 2, Fev, p. 183-186, 2008.

LENGYEL, P. Biochemistry of interferons and their actions. **Annual Reviews of Biochemistry**. v. 51, Jul, p. 251-282, 1982.

LEUSCHEN, MP; FILIPI, M; HEALEY, K. A randomized open label study of pain medications (naproxen, acetaminophen and ibuprofen) for controlling side effects during initiation of IFN β -1a therapy and during its ongoing use for relapsing-remitting multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 10, n. 6, Dez, p. 636-642, 2004.

LEWERENZ, M; MOGENSEN, KE; UZÉ, G. Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons. **Journal of Molecular Biology**. v. 282, n. 3, Set, p. 585-599, 1998.

LIU, CC et al. Interferon alpha inhibits spinal cord synaptic and nociceptive transmission via neuronal-glia interactions. **Scientific Reports**. v. 6, n. 34356, Set, p. 1-12, 2016.

LIU, XJ et al. Treatment of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling Src from the NMDA receptor complex. **Nature Medicine**. v. 14, n. 12, Dez, p. 1325-1332, 2008.

LOESER, JD; TREEDE, RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. v. 137, n. 3, Jul, p. 473-477, 2008.

LUBLIN, FD et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. **Neurology**. v. 83, n. 3, Jul, p. 278-286, 2014.

LUO, L et al. Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. **Neuroscience**. v. 144, n. 4, Fev, p. 1477-1485, 2007.

MacMICKING, JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 12, n. 5, Abr, p. 367-382, 2012.

MAEDA, S et al. Construction and identification of bacterial plasmids containing nucleotide sequence for human leukocyte interferon.

Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America. v. 77, n. 12, Dez, p. 7010-7013, 1980.

MAJOROS, A et al. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK–STAT Signaling: Lessons from interferons for Cytokine Responses. **Frontiers in Immunology.** v. 8, n. 29, Jan, p. 1-13, 2017.

MARIÉ, I; DURBIN, JE; LEVY, DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. **The EMBO Journal.** v. 17. n. 22, Nov, p. 6660-6669, 1998.

MATOS, SC; ZHANG, Z; SÉGUÉLA, P. Peripheral Neuropathy Induces HCN Channel Dysfunction in Pyramidal Neurons of the Medial Prefrontal Cortex. **The Journal of Neuroscience.** v. 35, n. 38, Set, p. 13244-12356, 2015.

McDONALD, WI et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. **Annals of Neurology.** v. 50, n. 1, Jul, p. 121-127, 2001.

McMAHON, SB; La RUSSA, F; BENNETT, DL. Crosstalk between the nociceptive and immune systems in host defence and disease. **Nature Reviews Neuroscience.** v. 16, n. 7, Jul, p. 389-402, 2015.

McNAMARA, CR et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America.** v.104, n. 33, Ago, p. 13525-13530, 2007.

McNEIL, BD et al. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. **Nature.** v. 519, n. 7542, Mar, p. 237-241, 2015.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology.** v. 1, n. 2, Nov, p. 135-145, 2001.

MENZIN, J et al. Narrative review of the literature on adherence to disease-modifying therapies among patients with multiple sclerosis. **Journal of Managed Care Pharmacy.** v. 19, n. 1, Jan, p. S24-S40, 2013.

MICROMEDEX. Interferon Alfa-2b side effects, 2016. Disponível em: < <http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/interferon-alfa-2b-injection-route/side-effects/drg-20071328>>. Acesso em: 15 de mar. 2016.

MILLER, DH et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 14, n. 9, Nov, p. 1157-1174, 2008.

MINETT, MS; QUICK, K; WOOD, JN. Behavioral Measures of Pain Thresholds. **Current Protocols in Mouse Biology**. v. 1, Set, p. 383-412, 2011.

MOGIL, JS et al. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. **Pain**. v. 80, n. 1-2, Mar, p. 67-82, 1999.

MOHR, DC et al. Side effect profile and adherence to in the treatment of Multiple Sclerosis with interferon beta-1a. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 4, n. 6, Dez, p. 487-489, 1998.

MORTAZAVI, D; KOUZANI, AZ; SOLTANIAN-ZADEH, H. Segmentation of multiple sclerosis lesions in MR images: a review. **Neuroradiology**. v. 54, n. 4, Abr, p. 299-320.

NAIDU, PS et al. Regulation of Inflammatory Pain by Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 334, n. 1, Jul, p. 182-190.

NEILLEY, LK et al. Side effect profile of interferon beta-1b in MS: Results of an open label trial. **Neurology**. v. 46, n. 2, Fev, p. 552-554, 1996.

NOH, S et al. The heart-rate-reducing agent, ivabradine, reduces mechanical allodynia in a rodent model of neuropathic pain. **European Journal of Pain**. v. 18, n. 8, Set, p. 1139-1147, 2014.

NORMAN, MU et al. Mast Cells Regulate the Magnitude and the Cytokine Microenvironment of the Contact Hypersensitivity Response. **The American Journal of Pathology**. v. 172, n. 6, Jun, p. 1638-1649, 2008.

NOSEWORTHY, JH et al., Multiple Sclerosis. **The New England Journal of Medicine**. v. 343, n. 13, Set, p. 938-952, 2000.

O'CONNOR, AB et al. Pain associated with multiple sclerosis: Systematic review and proposed classification. **Pain**. v. 137, n. 1, Out, p. 96-111, 2008.

O'ROURKE, KE; HUTCHINSON, M. Stopping beta-interferon therapy in multiple sclerosis: an analysis of stopping patterns. **Multiple Sclerosis Journal**. v. 11, n. 1, Fev, p. 46-50, 2005.

O'SHEA, JJ et al. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. **Annual Review of Medicine**. v. 66, Jan, p. 311-328, 2015.

OBREJA, O et al. IL-1 β potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. **FASEB Journal**. v. 16, n. 12, Out, p. 1497-1503, 2002.

OLIVEIRA, SM et al. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. **European Journal of Pharmacology**. v. 672, n. 1-3, Dez, p. 88-95, 2011.

OLIVEIRA, SM; SILVA, CR; FERREIRA, J. Critical role of protease-activated receptor 2 activation by mast cell tryptase in the development of postoperative pain. **Anesthesiology**. v. 118, n. 3, Mar, p. 679-690, 2013.

OREFICE, NS et al. Oral Palmitoylethanolamide Treatment Is Associated with Reduced Cutaneous Adverse Effects of Interferon- β 1a and Circulating Proinflammatory Cytokines in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. **Neurotherapeutics**. v. 13, n. 2, Abr, p. 428-438, 2016.

OWCZAREK, CM et al. Cloning and characterization of soluble and transmembrane isoforms of a novel component of the murine type I interferon receptor, IFNAR 2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 38, Set, p. 23865-23870, 1997.

PACHALY, J. Terapêutica por Extrapolação Alométrica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.). **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. 1a. ed. São Paulo: Roca, p. 1215–1223, 2006.

PANITCH, H et al. Randomized, comparative study of interferon β -1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. **Neurology**. v. 59, n. 10, Nov, p. 1496-1506, 2002.

PARADA, CA et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. v. 102, n. 4, Fev, p. 937-944, 2001.

PECZE, L et al. Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1+ neurons removes TRPA1 as well. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**. v. 36, n. 2, Mar, p. 234-241, 2009.

PERRILLO, RP. Hepatitis B surface antigen quantification as a current-day paradox: obtaining the gold in the face of diminishing returns. **Hepatology**. v. 49, n. 4, Abr, p. 1063-1065, 2009.

PESTKA, S et al. Interferons and their actions. **Annual Review of Biochemistry**. v. 56, Jul, p. 727-777, 1987.

PESTKA, S. The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 28, Jul, p. 20047-20051, 2007.

PESTKA, S; KRAUSE, CD; WALTER, MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**. v. 202, n. 1, Dez, p. 8-32, 2004.

PICCIOTTO, MR; WICKMAN, K. Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. **Physiological Reviews**. v. 78, n. 4, Out, p. 1131-1163, 1998.

PIEHLER, J et al. Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. **Immunological Reviews**. v. 250, n. 1, Nov, p. 317-334, 2012.

PINHO-RIBEIRO, FA; VERRI, WA Jr; CHIU, IM. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**. v. 38, n. 1, Jan, p. 5-19, 2017.

PLATANIAS, LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. **Nature Reviews Immunology**. v. 5, n. 5, Maio, p. 375-386, 2005.

PLATANIAS, LC. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 98, n. 2, Maio, p. 129-142, 2003.

POLMAN, CH et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology**. v. 69, n. 2, Fev, p. 292-302, 2011.

PORTACCIO, E; AMATO, MP; Improving Compliance with Interferon- β Therapy in Patients with Multiple Sclerosis. **CNS Drugs**. v. 23, n. 6, Jun, p. 453-462, 2009.

POSER, CM; BRINAR, VV. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: an historical review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 106, n. 3, Abr, p. 147-158, 2004.

PRISMS. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon β -1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. **Lancet**. v. 352, n. 9139, Nov, p. 1498-1504, 1998.

RANDOM.ORG. Random Sequence Generator, 2016. Disponível em: <<https://www.random.org/sequences/>>. Acesso em: 10 de jun. 2016.

RANE, SG; REDDY, EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. **Oncogene**. v. 19, n. 49, Nov, p. 5662-5679, 2000.

RANSOHOFF, RM et al. Multiple sclerosis – a quiet revolution. **Nature Reviews Neurology**. v. 11, Fev, p. 134-142, 2015.

REDER, AT; FENG, X. Aberrant type I interferon regulation in autoimmunity: opposite directions in MS and SLE, shaped by evolution and body ecology. **Frontiers in Immunology**. v. 4, n. 281, Set, p. 1-13, 2013.

REDIG, AJ et al. Activation of protein kinase C η by type I interferons. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 284, n. 16, Abr, p. 10301-10314, 2009.

REESS, J et al. Both paracetamol and ibuprofen are equally effective in managing flu-like symptoms in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during interferon beta-1a (AVONEX®) therapy. **Multiple Sclerosis Journal**. v.8, n. 1, Fev, p. 15-18, 2002.

REETZ, O; STADLER, K; STRAUSS, U. Protein kinase C activation mediates interferon- β -induced neuronal excitability changes in neocortical pyramidal neurons. **Journal of Neuroinflammation**. V. 11, n. 185, Out, p. 1-14, 2014.

REN, K; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**. v. 16, n. 11, Nov, p. 1267-1276, 2010.

RINTALA, A; HÄKKINEN, A; PALTAMAA, J. Ten-year follow-up of health-related quality of life among ambulatory persons with multiple sclerosis at baseline. **Quality of Life Research**. v. 25, n. 12, Jun, p. 3119-3127, 2016.

RÍO, J et al. Low-dose steroids reduce flu-like symptoms at the initiation of IFNbeta-1b in relapsing-remitting MS. **Neurology**. v. 50, n. 6, Jun, p. 1910-1912, 1998.

RIOL-BLANCO, L et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. **Nature**. v. 510, n. 7503, Jun, p. 157-161, 2014.

ROMERO, TR; DUARTE, ID. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**. v. 40, n. 4, Jul, p. 419-424, 2013.

ROOSTERMAN, D et al. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. **Physiological Reviews**. v. 86, n. 4, Out, p. 1309-1379, 2006.

ROXBURGH, RH et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. **Neurology**. v. 64, n. 7, Abr, p. 1144-1151, 2005.

RUBINSTEIN, M et al. Human leukocyte interferon: isolation and characterization of several molecular forms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 201, n. 1, Ago, p. 307-318, 1981.

RUNKEL, L et al. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta). **Pharmaceutical Research**. v. 15, n. 4, Abr, p. 641-649, 1998.

SANDKÜHLER, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiological Reviews**. v. 89, n. 2, Abr, p. 707-758, 2009.

SÁNDOR, K et al. Involvement of capsaicin-sensitive afferents and the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in xylene-induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. **Neuroscience Letters**. v. 451, n. 3, Fev, p. 204-207, 2009.

SAWYNOK, J; REID, A. Modulation of formalin-induced behaviors and edema by local and systemic administration of dextromethorphan, memantine and ketamine. **European Journal of Pharmacology**. v. 450, n. 2, Ago, p. 153-162, 2002.

SAWYNOK, J; REID, A. Peripheral interactions between dextromethorphan, ketamine and amitriptyline on formalin-evoked behaviors and paw edema in rats. **Pain**. v. 102, n. 1-2, Mar, p. 179-186, 2003.

SCHILLERS, F et al. Propacetamol-Induced Injection Pain Is Associated with Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 359, n. 1, Out, p. 18-25, 2016.

SCHINDLER, C; LEVY, DE; DECKER, T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 28, Jul, p. 20059-20063, 2007.

SCHNEIDER, WM; CHEVILLOTTE, MD; RICE, CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. **Annual Review of Immunology**. v. 32, Fev, p. 513-545, 2014.

SCHNORR, S et al. HCN2 channels account for mechanical (but not heat) hyperalgesia during long-standing inflammation. **Pain**. v. 155, n. 6, Jun, p. 1079-1090, 2014.

SCHRODER, K et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 75, n. 2, Fev, p. 163-189.

SEHGAL, PB; WALTHER, Z; TAMM, I. Rapid enhancement of β_2 -interferon/B-cell differentiation factor BSF-2 gene expression in human fibroblasts by diacylglycerols and the calcium ionophore A23187. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v.84, n. 11, Jun, p. 3663-3667, 1987.

SHARMA, V; McNEILL, JH. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **British Journal of Pharmacology**. v. 157, n. 6, Jul, p. 907-921, 2009.

SHEPPARD, P et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature Immunology**. v. 4, n. 1, Jan, p. 63-68, 2003.

SHERRINGTON, CS. The integrative action of the nervous system. Scribner, New York, p. 446, 1906.

SHIMODA, K et al. Jak1 plays an essential role for receptor phosphorylation and Stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**. v. 90, n. 2, Jul, p. 597-604, 1997.

SIMONE, IL et al. Influence of Interferon beta treatment on quality of life in multiple sclerosis patients. **Health and Quality of Life Outcomes**. v. 4, n. 96, Dez, 2006.

SINGER, B et al. Comparative injection-site pain and tolerability of subcutaneous serum-free formulation of interferon β -1a versus subcutaneous interferon β -1b: results of the randomized, multicenter, Phase IIIb REFORMS study. **BMC Neurology**. v. 12, n. 154, Dez, p. 1-11, 2012.

Skin versus Skin Plus Deep Tissue Incision. **Anesthesiology**. v. 112, n. 1, Jan, p. 153-164, 2010.

STADLER, K et al. Elevation in Type I Interferons Inhibits HCN1 and Slows Cortical Neuronal Oscillations. **Cerebral Cortex**. v. 24, n. 1, Jan, p. 199-210, 2014.

STARK, GR et al. How cells respond to interferons. **Annual Reviews of Biochemistry**. v. 67, Jul, p. 227-264, 1998.

STARK, GR; DARNELL JE Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. **Immunity**. v. 36, n. 4, Abr, p. 2503-514, 2012.

STORY, GM et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**. v. 112, n. 6, Mar, p. 819-829, 2003.

SUN, Q et al. Ectopic discharges from injured nerve fibers are highly correlated with tactile allodynia only in early, but not late, stage in rats with spinal nerve ligation. **Experimental Neurology**. v. 191, n. 1, Jan, p. 128-136, 2005.

SWIETER, M et al. Interferon-alpha/beta inhibits IgE-dependent histamine release from rat mast cells. **Immunology**. v. 66, n. 4, Abr, p. 606-610, 1989.

TAILOR, P et al. The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. **Immunity**. v. 27, n. 2, Ago, p. 228-239, 2007.

TAKASU, K; ONO, H; TANABE, M. Spinal hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels at primary afferent terminals contribute to chronic pain. **Pain**. v. 151, n. 1, Out, p. 87-96, 2010.

TALPAZ, M et al. Re-emergence of interferon- α in the treatment of chronic myeloid leukemia. **Leukemia**. v. 27, n. 4, Abr, p. 803-812, 2013.

THE IFN β MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neurology**. v. 43, n. 4, Abr, p. 655-661, 1993.

The Jackson Laboratory. B6.129S2-Ifnar1^{tm1Agt/Mmjax} Mouse Strain Datasheet, 2016. Disponível em: <<https://www.jax.org/strain/010830>>. Acesso em: 5 de nov. 2016.

THOMAS, C et al. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. **Cell**. v. 146, n. 4, Ago, p. 621-632, 2011.

TIBBS, GR; POSSON, DJ; GOLDSTEIN, PA. Voltage-Gated Ion Channels in the PNS: Novel Therapies for Neuropathic Pain? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 37, n. 7, Jul, p. 522-542, 2016.

TONELLO, R et al. The peptide Ph α 1 β , from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice. **British Journal of Pharmacology**. v. 174, n. 1, Jan, p. 57-69, 2017.

TORKILDSEN, O; MYHR, KM; BO, L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis – a review of approved medications. **European Journal of Neurology**. v. 23, n. 1, Nov, p. 18-27, 2015.

TÓTH, BI et al. TRP channels in the skin. **British Journal of Pharmacology**. v. 171, n. 10, Maio, p. 2568-2581, 2014.

TOVEY, MG; LALLEMAND, C. Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Interferons. **Pharmaceuticals**. v. 3, n. 4, Abr, p. 1162-1186, 2010.

TRÄNKNER, D et al. Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**. v. 111, n. 31, Ago, p. 11515-11520, 2014.

TREADAWAY, K et al. Factors that influence adherence with disease-modifying therapy in MS. **Journal of Neurology**. v. 256, n. 4, Abr, p. 568-576, 2009.

TREVISAN, G et al. Mechanisms Involved in Abdominal Nociception Induced by Either TRPV1 or TRPA1 Stimulation of Rat Peritoneum. **Europena Journal of Pharmacology**. v. 714, n. 1-3, Ago, p. 332-344, 2013.

TREVISAN, G et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain**. v. 139, n. Pt 5, Maio, p. 1361-1377, 2016.

TRINCHIERI, G. Type I interferon: friend or foe? **The Journal of Experimental Medicine**. v. 207, n. 10, Set, p. 2053-2063, 2010.

TRINCHIERI, G; SANTOLI, D. Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 147, n. 5, Maio, p. 1314-1333.

TRUETT, GE et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). **Biotechniques**. v. 29, n. 1, Jul, p. 52-54, 2000.

TSANTOULAS, C; MOONEY, ER; McNAUGHTON, PA. HCN2 ion channels: basic science opens up possibilities for therapeutic intervention in neuropathic pain. **The Biochemical Journal**. v. 473, n. 18, Set, p. 2717-2736, 2016.

TU, H et al. Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels: roles in the differential electrophysiological properties of rat primary afferent neurons. **Journal of Neuroscience Research**. v. 76, n. 5, Jun, p. 713-722, 2004.

TUOHY, VK et al. Modulation of the IL-10/IL-12 cytokine circuit by interferon- β inhibits the development of epitope spreading and disease progression in murine autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**. v. 111, n. 1-2, Nov, p. 55-63, 2000.

VALLÉS, L et al. Lipotrophy associated with interferon alfa adjuvant therapy for melanoma. **Archives of Dermatology**. v. 145, n. 1, Jan, p. 98-99, 2009.

VASCONCELOS, CCF et al. Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 151, n. 2016, Jul, p. 24-30, 2016.

VAY, L; GU, C; McNAUGHTON, PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. **British Journal of Pharmacology**. v. 165, n. 4, Fev, p. 787-801, 2012.

VELÁZQUEZ, KT; MOHAMMAD, H; SWEITZER, SM. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. **Pharmacological Research**. v. 55, n. 6, Jun, p. 578-589, 2007.

VERRI, WA Jr et al. Hypnociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**. v. 112, n. 1, Out, p. 116-138, 2006.

VICENT, L et al. Mast cell activation contributes to sickle cell pathobiology and pain in mice. **Blood**. v. 122, n. 11, Set, p. 1853-1862, 2013.

WALTER, MR et al. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high-affinity receptor. **Nature**. v. 376, n. 6537, Jul, p. 230-235, 1995.

WALTHER, EU; HOHLFELD, R. Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. **Neurology**. v. 53, n. 8, Nov, p. 1622-1627, 1999.

WALTHER, EU; HOHLFELD, R. Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management. **Neurology**. v. 53, n. 8, Nov, p. 1622-1627, 1999.

WANG, J et al. NF-kappa B RelA subunit is crucial for early IFN-beta expression and resistance to RNA virus replication. **Journal of Immunology**. v. 185, n. 3, Ago, p. 1920-1929, 2010.

WAXMAN, SG; ZAMPONI, GW. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. **Nature Neuroscience**. v. 17, n. 2, Fev, p. 153-163, 2014.

WEERD, NA et al. Structural basis of a unique interferon- β signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. **Nature Immunology**. v. 14, Jul, p. 901-907, 2013.

WEERD, NA; NGUYEN, T. The interferons and their receptors – distribution and regulation. **Immunology and Cell Biology**. v. 90, n. 5, 483-491, 2012.

WENG, X et al. Chronic inflammatory pain is associated with increased excitability and hyperpolarization-activated current (I_h) in C- but not A δ -nociceptors. **Pain**. v. 153, n. 4, Abr, p. 900-914, 2012.

WINGERCHUK, DM; WEINSHENKER, BG. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. **BMJ**. v. 354, n. 3518, Ago, p. 1-16, 2016.

WOOD, JN; PERL, ER. Pain. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 9, n. 3, Jun, p. 328-332, 1999.

WOOLF, CJ. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, n. 11, Nov, p. 3742-3744, 2010.

WOOLF, CJ; MA, Q. Nociceptors – noxious stimulus detectors. **Neuron**. v. 55, n. 3, Ago, p. 353-364, 2007.

WU, J; CHEN, ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. **Annual Reviews of Biochemistry**. v. 32, Mar, p. 461-488, 2014.

XU, J; BRENNAN, TJ. Guarding Pain and Spontaneous Activity of Nociceptors after

YANG, CH et al. Interferon- α activates NF- κ B in JAK1-deficient cells through a TYK2-dependent pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 27, Jul, p. 25849-25853, 2005.

YOUNG, GT et al. Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. **Pain**. v. 155, n. 9, Set, p. 1708-1719, 2014.

ZHAO, C; LEITIGES, M; GEREAU, RW. Isozyme-Specific Effects of Protein Kinase C in Pain Modulation. **Anesthesiology**. v. 115, n. 6, Dez, p. 1261-1270, 2011.

ZHOU, C et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels may contribute to regional anesthetic effects of lidocaine. **Anesthesiology**. v. 122, n. 3, Mar, p. 606-618, 2015.

ZUO, Y et al. Inflammation and Hyperalgesia Induced by Nerve Injury in the Rat: A Key Role of Mast Cells. **Pain**. v. 105, n. 3, Out, p. 467-479, 2003.

ANEXO I

Parecer de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC para os protocolos utilizados no presente estudo

<http://notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe9931c868325702e0075533...>

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00872

Título

Métodos para pesquisa de mecanismos envolvidos na dor aguda e crônica para a descoberta de novos fármacos analgésicos.

Data de Entrada

01/07/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/11/2013

Considerações

Ofício nº 117/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Juliano Ferreira, Departamento de Farmacologia – CCB.

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: dois mil trezentos e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*) e dois mil trezentos e quatro camundongos (*Mus Musculus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC e Laboratório de Farmacologia Experimental.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 07/02/2018

Data 07/11/2013

Parecer(es):

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**